

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Validace a aplikace HPLC metody pro stanovení
sacharidů a askorbové kyseliny v ovoci a zelenině**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Kubaschová

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Validace a aplikace HPLC metody pro stanovení sacharidů a askorbové kyseliny v ovoci a zelenině" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Lence Kouřimské Ph.D. za vstřícné a milé jednání, cenné rady a pomoc, také za poskytnutý materiál při zpracování mé diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala panu Ing. Pavlu Novému za pomoc při práci v laboratoři.

Validace a aplikace HPLC metody pro stanovení sacharidů a askorbové kyseliny v ovoci a zelenině

Validation and application of HPLC method for determination of sugars and ascorbic acid in fruit and vegetables

SOUHRN

Ovoce a zelenina jsou zdrojem řady nutričně cenných látek, mezi které patří také kyselina askorbová a sacharidy. Kyselina askorbová je hydrofilní vitamin citlivý na teplo a je zároveň oxylabilní. Vitamin C je pro organismus velmi důležitým antioxidantem, tedy látkou bránící oxidaci jiných látek. Veškerá potřeba vitaminu C je kryta vitaminem z potravy a to zeleninou (30 – 40 %) a ovocem (30 – 35 %). Hlavním zdrojem energie ve výživě člověka jsou sacharidy. Je to velmi pestrá skupina látek a proto je těžké popsat je jednotnou definicí. V předložené práci byly analyzovány tři hlavní sacharidy jablek a mrkvi a to glukosa, fruktosa a disacharid sacharosa.

Pro stanovení kyseliny askorbové a sacharidů v ovoci a zelenině existuje řada analytických metod. Kromě titračních, spektrofotometrických, elektrochemických a jiných metod je účinné a hojně využívané stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Pro stanovení reálných vzorků byla v práci využita metoda HPLC, která byla zároveň optimalizována a validována. Pro analýzu vitaminu C byl použit HPLC systém se spektrofotometrickým detektorem, pro sacharidy pak refraktometrická detekce. Obě metody se po validaci ukázaly jako dostatečně spolehlivé a přesné v rozsahu naměřené kalibrace.

Analýza reálných vzorků byla provedena u sedmi odrůd jablek a dvou druhů mrkvi. Všechny odrůdy byly vypěstovány ekologickým a integrovaným způsobem produkce. Stěžejním výsledkem experimentální části bylo porovnání obsahu kvalitativních parametrů (sacharidů, vitaminu C) bio produktů s integrovanými plodinami. Následně byla u výsledků zhodnocena statistická průkaznost. Dle předložené práce lze tvrdit, že nebyl nalezen průkazný rozdíl v obsahu kyseliny askorbové, glukosy, fruktosy a sacharosy mezi ekologickými a integrovanými odrůdami analyzovaných jablek a mrkvi.

Klíčová slova: glukosa, fruktosa, sacharosa, askorbová kyselina, HPLC, jablka a mrkve

SUMMARY

Fruits and vegetables are the sources of many nutritionally valuable substances. These substances include ascorbic acid and carbohydrates. Ascorbic acid is a hydrophilic heat-sensitive vitamin and it is unstable in the air. Vitamin C is very important antioxidant for the organism and it prevents the oxidation for other substances. The total need of vitamin C is covered by a vitamin from food, from vegetables (30-40%) and fruits (30-35%). Carbohydrates are in human nutrition the main source of energy. It is a very diverse group of substances and therefore it is difficult to describe their common definition. In the thesis were analyzed three major carbohydrates (glucose, fructose and disaccharide sucrose) in apples and carrot.

There are many analytical methods for the determination of ascorbic acid and carbohydrates in fruits and vegetables. Besides titration, spectrophotometric, electrochemical, and other methods there is effective and widely used determination by high performance liquid chromatography (HPLC).

In this thesis was the method used to determine the real samples, and has also been optimized and validated. For the analysis of vitamin C was used HPLC system with spectrophotometric detection and for carbohydrate refractometric detection. Both methods after validation proved sufficiently reliable and precise in the range of measured calibration.

Analysis of real samples was conducted in seven varieties of apples and two varieties of carrots. All varieties have been grown organic and integrated way of production. A key result of the study was comparison of the content of qualitative parameters (carbohydrates, vitamin C) organic products with integrated products. The results were evaluated statistical relevance. According to these results it is evident that there are no differences in the content of ascorbic acid, glucose, fructose and sucrose between organic and integrated analyzed varieties of apples and carrots.

Keywords: glucose, fructose, sucrose, ascorbic acid, HPLC, apples and carrot

OBSAH

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíl práce.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	Vitaminy	11
3.1.1	Vitamin C.....	12
3.1.2	Struktura vitamínu C	14
3.1.3	Reakce vitamínu C	14
3.1.4	Analytické stanovení vitamínu C	15
3.1.4.1	Titrační metoda	15
3.1.4.2	Potenciometrie	16
3.1.4.3	Elektrochemické metody.....	16
3.1.4.4	Spektrofotometrické metody	16
3.1.4.5	Chromatografické metody	16
3.1.5	Příklady analytického stanovení vitamínu C metodou HPLC	17
3.2	Sacharidy	19
3.2.1	Rozdělení sacharidů	20
3.2.2	Reakce sacharidů	24
3.2.3	Analytické stanovení sacharidů	25
3.2.3.1	Titrační metoda	25
3.2.3.2	Denzitometrická metoda	25
3.2.3.3	Refraktometrická metoda	25

3.2.3.4	Polarimetrická metoda	26
3.2.3.5	Chromatografické metody	26
3.2.4	Příklady analytického stanovení sacharidů metodou HPLC	26
3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC	28
3.3.1	Instrumentace HPLC metody	29
3.3.2	Analytické vyhodnocení chromatogramu	34
3.4	Nutriční jakost ekologické suroviny versus integrovaná surovina	37
4	Materiál a metody	39
4.1	Stanovení sušiny u ovoce a zeleniny	39
4.2	Stanovení vitamínu C	39
4.2.1	Použitý materiál	39
4.2.2	Použité pomůcky a přístroje	40
4.2.3	Použité chemikálie	40
4.2.4	Příprava roztoků k analýze	41
4.2.5	Příprava vzorků	41
4.3	Stanovení sacharidů	42
4.3.1	Použitý materiál	42
4.3.2	Použité pomůcky a přístroje	42
4.3.3	Použité chemikálie	43
4.3.4	Příprava roztoků k analýze	43
4.3.5	Příprava vzorků	44
5	Výsledky	45

5.1	Stanovení sušiny v plodech jablek a mrkví	45
5.2	Validace metody	46
5.2.1	Sestrojení kalibračních křivek	46
5.3	Stanovení vitamínu C v plodech jablek a mrkví metodou HPLC	48
5.3.1	Stanovení vitamínu C u reálných vzorků vybraných odrůd jablek	48
5.3.2	Stanovení vitamínu C u reálných vzorků vybraných odrůd mrkví	49
5.4	Stanovení sacharidů v plodech jablek a mrkví metodou HPLC	50
5.4.1	Stanovení sacharidů u reálných vzorků vybraných odrůd jablek	50
5.4.2	Stanovení sacharidů u reálných vzorků vybraných odrůd mrkví	52
6	Diskuze	55
7	Závěr	59
8	Seznam literatury	60

1. ÚVOD

Zájem o ekologické zemědělství se v posledních letech velmi zvýšil. Jedním z hlavních pozitiv ekologické produkce je šetrný přístup k životnímu prostředí, s čímž souvisí menší výskyt toxických látek v našem okolí a také ve stravě. Nákup biopotravin se v současnosti stává trendem, i když veřejnost nedokáže snadno rozlišit organické výrobky od těch konvenčních. Bio produkty jsou často mnohokrát dražší a v neposlední řadě není prokázána jejich větší nutriční kvalita. Jedním z poznatků, které jsou mnohými vědeckými studiemi analyzovány, je, jestli jsou ekologicky pěstované potraviny bezpečnější. Obecně lze tvrdit, že se u nich vyskytují nižší obsahy chemických a toxických látek, jako jsou na příklad rezidua pesticidů, těžké kovy a dusičnany. Riziko u ekologicky pěstovaných plodin není však úplně nulové, neboť za určitých okolností se může objevit zvýšený obsah přírodních toxických látek, nebo také sekundární metabolity plísní (mykotoxiny). Negativním prvkem pro zemědělce mohou být nižší výnosy u pěstovaných plodin.

V současné době existuje několik studií zabývajících se posouzením kvality plodin z ekologické a integrované zemědělské produkce s cílem objektivně zhodnotit možné rozdíly v jednotlivých jakostních parametrech. Je nutné ale konstatovat, že doposud zveřejněné publikace a studie jednoznačně nepotvrdily fakt, který by poukazoval na vyšší nutriční kvalitu ekologických plodin oproti plodinám z konvenční a integrované produkce.

Mezi nejběžnější pěstované druhy ovoce a zeleniny v našich přírodních podmínkách patří jablka a mrkve. Tyto plodiny jsou důležitou součástí našeho jídelníčku, kde mají nezastupitelné místo. Obsahují totiž celou řadu prospěšných látek pro náš organismus, jako jsou například vitaminy. Obsahují také antioxidanty, ke kterým se řadí i kyselina askorbová. Díky přítomnosti sacharidů a organických kyselin jsou i po sensorické stránce velmi chutnou potravinou. V mrkvi je navíc hojně zastoupen vitamin A. Kyselina askorbová a sacharidy patří tedy mezi nutričně cenné složky ovoce a zeleniny. Pro vnitřní kvalitu jablek, mrkví, ale i ostatních plodin jsou velmi důležité parametry, jako např. typ pěstované odrůdy, podnebí, typ půdy a následné podmínky skladování. Na všechny výše zmíněné faktory je nutné brát zřetel a vybírat si tedy dle uvážení vhodné plodiny a potraviny do svého jídelníčku.

2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Předložená diplomová práce řešila dvě základní hypotézy:

1. HPLC techniky jsou vhodné pro analýzu vitamínu C a sacharidů v ovoci a zelenině.
2. Obsah stanovených parametrů jakosti je závislý na způsobu produkce.

Cílem diplomové práce bylo podat ucelený soubor poznatků o vlastnostech a možnostech stanovení kyseliny askorbové, mono- a disacharidů v ovoci a zelenině pomocí HPLC metody s UV či RI detekcí. Metodu bylo třeba nejprve optimalizovat a validovat pro následné ověření v praxi na reálných vzorcích. Dále bylo cílem porovnat koncentrace sacharidů a kyseliny askorbové, srovnat je s literárními údaji a zjistit jsou-li rozdílné parametry v jakosti mezi ekologickými produkty a plodinami integrované produkce. Tyto rozdíly a tvrzení bylo třeba následně statisticky prokázat.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 VITAMINY

Vitaminy řadíme mezi biokatalyzátory, to jsou látky, které v organismu vykonávají předem dané regulační a řídicí funkce. Biokatalyzátory jsou endogenního nebo exogenního původu. První zmíněné katalyzátory vznikají přímo v organismu, pro který jsou nezbytné (jsou to enzymy a hormony). Naopak exogenní biokatalyzátory, do kterých se řadí právě vitaminy, musí organismus přijímat spolu se stravou, protože si je neumí sám syntetizovat (Velíšek, 2002).

Z chemického hlediska jsou vitaminy exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny, mezi nimiž není žádná chemická příbuznost. Tím zaniká možnost jejich klasifikace podle strukturního hlediska. Začalo se proto používat třídění podle fyzikálních vlastností, a to především podle rozpustnosti. Podle ní dělíme vitaminy na rozpustné ve vodě (hydrofilní) a rozpustné v tucích (lipofilní). Kromě rozpustnosti se obě skupiny liší ještě i v některých základních biologických vlastnostech. Ve vodě rozpustné vitaminy se nemohou v organismu ukládat, proto při jejich příjmu v nadbytku dochází k jejich vylučování močí. V tucích rozpustné vitaminy naopak mohou být v organismech skladovány (Vodrážka, 1996).

Vitaminy rozpustné ve vodě jsou vitaminy skupiny B a to thiamin (B1), riboflavin (B2), kyselina nikotinová (B3), kyselina pantothenová (B5), pyridoxin (B6), kyselina listová (B9), kobalamin (B12), biotin (vitamin H), kyselina lipová, bioflavonoidy (dříve řazeny jako vitamin P), vit C (kyselina L-askorbová a L-dehydroxyaskorbová).

Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří retinol (vitamin A), kalciferol (vitamin D), tokoferol (vitamin E), fylochinon (vitamin K) a vitamin F (esenciální mastné kyseliny) (Honza a Kramářová, 2006).

Každý vitamin se musí přijímat denně v optimální dávce, jinak se při nižším příjmu po čase vytvoří hypovitaminóza, která se projevuje různými poruchami. Při úplném nedostatku vitamínu ve stravě vznikne avitaminóza, jejíž příznaky se nemusí projevit ihned, ale až za několik týdnů, měsíců a dokonce i let. U některých vitaminů je škodlivé i nadměrné zvýšení denní dávky (např. vit A, D), kdy může nastat hypervitaminóza. Příjem vitaminů mohou ve stravě snižovat antivitaminy (Pánek a kol., 2002).

3.1.1 Vitamin C

Vitamin C je nezbytný k životu a v lidském těle plní mnoho důležitých funkcí. Je velmi nestabilní, to znamená, že je citlivý na teplo a vysoce oxylabilní. Jeho přesný chemický název je kyselina L-askorbová neboli L-enantiomer kyseliny askorbové, její sumární vzorec je $C_6H_8O_6$ (Velíšek, 1999).

Základní biologicky aktivní sloučeninou vitamínu C je kyselina askorbová. V přírodě se nachází ve dvou formách, kyselina askorbová jako redukovaná forma a kyselina dehydroaskorbová jako oxidovaná forma. Tato kyselina má silné redukční vlastnosti, lehce se oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a vytváří tak v přírodě důležitý oxidačně-redukční systém. Hlavní funkcí kyseliny askorbové je účast na oxidoredukčních dějích v organismu. Účastní se také biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa a jeho transportu. Stimuluje transport sodných, chloridových a zřejmě i vápenatých iontů. Vitamin C dále hraje potřebnou úlohu při tvorbě červených krvinek, je velmi důležitým antioxidantem, tedy látkou bránící oxidaci jiných látek (reakce s volnými radikály). Má ochrannou funkci i pro labilní formy kyseliny listové. Vitamin C se uplatňuje i v metabolismu cholesterolu a inhibuje také tvorbu nitrosaminů, působí tak jako modulátor mutagenese a karcinogenese. Posílení imunitního systému v souvislosti s dostatečným zásobením lidského organismu právě vitamínem C je všeobecně známo. Doporučené denní dávky (DDD) vitamínu C připadají u dospělého člověka na 100 – 200 mg (Vodrážka, 1996), dle vyhlášky 450/2004 je pak DDD vitamínu C 80 mg. Veškerá potřeba vitamínu C je kryta vitamínem z potravy, hlavně bramborami (asi 20 – 30 %), zeleninou (asi 30 – 40 %) a ovocem (30 – 35 %). Celkový obsah kyseliny askorbové v mrkvi je 50 – 100 $mg \cdot kg^{-1}$, 15 – 50 $mg \cdot kg^{-1}$ obsahu vitamínu C připadá na jablka. Mléko se na krytí potřeby podílí z necelých 10 % (Velíšek, 1999). Kopec (1998) ve svých tabulkách nutričních hodnot ovoce a zeleniny uvádí obsah vitamínu C u jablek 48 $mg \cdot kg^{-1}$ a mrkve 49 $mg \cdot kg^{-1}$. Rop a kol. (2009) stanovili u vybraných odrůd jablek obsah vitamínu C v rozmezí 9,22 – 12,38 $mg \cdot 100 g^{-1}$ v čerstvé hmotě. Další zdroj uvádí obsah kyseliny askorbové v mrkvích na 7,8 $mg \cdot 100 g^{-1}$, odrůdy mrkví byly vybrány z různých zeměpisných oblastí Spojených států a celkový výsledek je průměr (Klein and Perry, 2006).

Příznaky nedostatku vitamínu C jsou slabost, únava, sklon k infekcím, svalové bolesti, zhoršení hojivosti ran a jedním z nejznámějších příznaků avitaminosy jsou kurděje (scorbut) (Štefánek, 2011).

Askorbová kyselina má díky svým vlastnostem široké použití jako potravinářské aditivum především v konzervářské a kvasné technologii, v technologii masa, tuků a v cereální technologii. Jako konzervační látka je kyselina askorbová vedená pod kódem E 300 a je užitečná např. k zachování barvy zpracovaného masa a vyblednutí ovocných šťáv. Je prevencí tvorby oxidačních zákalů a organoleptických změn piva, ke kterým dochází při pasteraci a skladování. Vitamin C jako aditivní látka obecně nemá žádné nežádoucí účinky, ale při dlouhodobém nadměrném příjmu (10 gramů denně a více) může dojít až ke vzniku ledvinových kamenů či ucpání tenkého střeva (Náprstek, 2012).

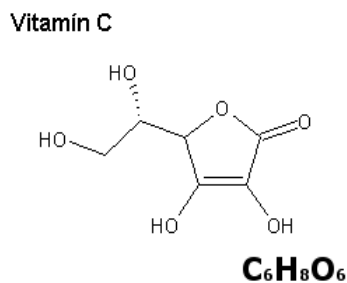
Vitamin C se v nápojích může rychle rozkládat, proto je důležitá konzumace čerstvé zeleniny a ovoce. V České republice je přídavek vitamínu C povolen ke všem potravinám a to i při výrobě dětských příkrmů. Kyselina L-askorbová se průmyslově vyrábí chemickou syntézou z hroznového cukru. Lze ji také získat přímou extrakcí z ovoce a zeleniny, ale tato metoda je dražší (Náprstek, 2012).

Vitamin C je velmi nestabilní a reaguje na vzduch, teplo a vlhkost mimořádně citlivě. Jako obecné pravidlo platí, že ztráty vitamínu C jsou o tolik vyšší, o kolik tepleji a delší dobu se potraviny skladují. Je třeba mít na mysli, že zelenina reaguje z hlediska ztráty vitamínu C různě citlivě. Hlávkové zelí lze uchovávat dokonce několik měsíců beze ztráty vitamínu C. Teplo ale odbourávání vitamínu C urychluje, tomu napomáhají speciální enzymy, které jsou zvláště účinné při teplotách kolem 40 °C, při 70 °C dochází však k jejich inaktivaci. Proto by se měla zelenina rychle přivést do vyšších teplot a pak pomalu připravovat. Přitom sice ztráta vitamínu pokračuje, ale značně pomaleji. Jedním účinným postupem je například blanšírování.

Při kuchyňské úpravě se může obsah vitamínu C v potravinách snížit o dalších 70 %. Krátké omytí syrové nenakrájené zeleniny většinou nezpůsobuje žádné změny v obsahu vitamínu. Naproti tomu namáčení, které se často používá ve velkokapacitních kuchyních, vede ke ztrátám vitamínu C vyluhováním. Čím déle toto vyluhování trvá, tím jsou ztráty vitamínu C větší. Při rozmělnování, krájení, strouhání nebo mixování ovoce a zeleniny se díky zvýšenému množství ploch a zároveň díky porušení buněčné tkáně urychluje enzymatické odbourávání vitamínu C. Při rychlém a pečlivém zmrazení lze ztráty vitamínu udržet relativně nízké, což znamená, že hluboko zmrazená zelenina často vykazuje více vitamínu C než čerstvé ovoce a zelenina, které je skladováno mnohem kratší dobu (Lešková a kol., 2006; Velíšek, 1999).

3.1.2 Struktura vitamínu C

Obrázek 1. Chemická struktura vitamínu C

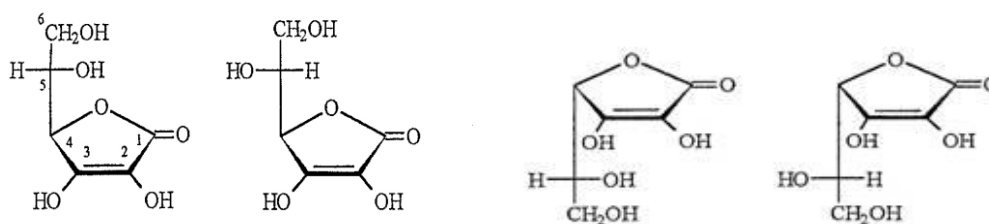


(Navrátilová, 2009)

Kyselina L-askorbová je γ -lakton hexonové kyseliny s endiolovou strukturou na druhém a třetím uhlíku, viz obrázek 1. Lze ji odvodit od několika různých hexos. Názvem vitamin C se však označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý její reverzibilní redoxní systém, který zahrnuje její L-askorbylradikál (kyselinu L-monodehydro-askorbovou) a kyselinu L-dehydroaskorbovou (Honza a Kramářová, 2006).

Ze čtyř možných stereoisomerů, které jsou uvedeny na obrázku 2 (L- a D-askorbová kyselina, L- a D-isoaskorbová kyselina) vykazuje aktivitu vitamínu C pouze L-askorbová kyselina a její isomer D-askorbová kyselina.

Obrázek 2. Chemické izomery vitamínu C



L-askorbová kyselina D-isoaskorbová kyselina D-askorbová kyselina L-isoaskorbová kyselina

(Jančář a Sichová, 2005)

3.1.3 Reakce vitamínu C

Nejvýznamnější reakcí kyseliny askorbové je autooxidace, jinak řečeno oxiduje na vzdušném kyslíku a to způsobí ztrátu vitamínu C při zpracování potravin. Reakce probíhá jak v přítomnosti tak i nepřítomnosti iontů přechodných kovů, kdy jsou nejvíce problematickými

kovy trojmocné železo a dvojmocná měď. Velmi důležitým faktorem pro reakci je také pH prostředí, v kyselém prostředí je totiž reakce pomalá a v alkalickém naopak.

Mezi další významné reakce kyseliny patří reakce s volnými radikály, což jsou látky, které způsobují oxidaci tuků a jiných oxylabilních složek v potravinách. Právě touto reakcí je vitamin C považován za antioxidant, protože brzdí řetězovou autooxidaci lipidů.

Ke ztrátám vitamínu C však může dojít i v konzervovaných potravinách za nepřístupu kyslíku a to díky kyselému prostředí, které způsobí dekarboxylaci a dehydrataci kyseliny. Mezi další ztráty vitamínu C způsobené reakcemi jsou řazeny reakce kyseliny askorbové s chinony vznikajícími při enzymovém hnědnutí, reakce s dusitany a hemovými barvivy v mase a masných výrobcích (Velíšek, 2002; Vodrážka, 1996).

3.1.4 Analytické stanovení vitamínu C

Stanovení vitaminů v potravinách je velmi složitý úkol, neboť jejich koncentrace jsou ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízké. Vitamíny jsou rovněž látky ve většině případů velmi citlivé k oxidaci a světelnému záření.

V literárních zdrojích je uvedena řada metod, které byly vypracovány právě ke stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v různých typech vzorků. V praxi se uplatnily ale jen některé. Jde především o titrační, fotometrické a chromatografické techniky, ale je možné použít i polarografii, voltimetrii, potenciometrii či fluorimetrii (Kubáň, 2007).

3.1.4.1 Titrační metoda

Sichová a Jančář (2005) uvádějí, že jde o titrační stanovení askorbové kyseliny pomocí 2,6-dichlorfenolindofenolu, kdy se askorbová kyselina v kyselém prostředí oxidačně-redukčním indikátorem 2,6-dichlorfenolindofenolem na dehydroxyaskorbovou kyselinu, 2,6-dichlorfenolindofenol se redukuje na bezbarvou bázi. Metoda je použitelná pro většinu potravinářských výrobků. Není však specifická a je rušena především látkami obsahujícími thiolové skupiny a reduktony. Titrační metoda je velmi rychlá a vhodná především pro sledování úbytku askorbové kyseliny během technologického procesu. Pro vzorky s nízkým obsahem askorbové kyseliny dává relativně nejlepší výsledky.

3.1.4.2 Potenciometrie

Potenciometrie je často používanou objektivní metodou k zjišťování bodu ekvivalence při titračním stanovení. Potenciometrické titrace jsou založené na měření závislosti potenciálu vhodné indikační elektrody na objemu titračního činidla přidaného do titrovaného roztoku. Metoda je využívána ke stanovení obsahu vitamínu C ve vzorcích, které jsou výrazně zbarvené a vizuální detekce bodu ekvivalence tak není možná (Arya et al., 2000).

3.1.4.3 Elektrochemické metody

Mezi elektrochemické metody řadíme metodu polarografickou. Tato metoda využívá ke stanovení kyseliny askorbové její oxidaci na rtuťové kapkové elektrodě a redukci chinoxalinového derivátu, který vzniká kondenzací kyseliny dehydroaskorbové s o-fenylendiaminem. Metoda je vhodná pro většinu potravin, je značně specifická a není rušena ostatními látkami přítomnými ve vzorku. Lze ji použít pro stanovení v ovoci, zelenině, bramborách syrových i tepelně upravovaných, v mase a masných výrobcích. Polarografická metoda je ale v praxi využívána jen zřídka pro relativně velkou spotřebu rtuti při vlastní analýze a také díky jejím toxickým výparům (Arya et al., 2000).

3.1.4.4 Spektrofotometrické metody

Princip metody je založen na reakci kyseliny dehydroaskorbové s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za tvorby nerozpustného produktu osazonu, který se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm. Ve vzorku se askorbová kyselina zoxiduje na dehydroaskorbovou a stanoví se souhrnně s 2,3-dioxogulonovou kyselinou. Nebo lze také kyselinu dehydroxyaskorbovou stanovit po redukci na askorbovou kyselinu (pomocí H₂S, cysteinu, homocysteinu) titračně 2,6-dichlorfenolindofenolem (Kubáň, 2007).

3.1.4.5 Chromatografické metody

Papírová chromatografie TC slouží pouze pro orientační měření. Princip této metody spočívá oddělením askorbové kyseliny chromatografií na papíře od ostatních rušivých látek. Skvrny se vylučují a askorbová kyselina se stanoví kolorimetricky z úbytku absorbance modrého zbarvení 2,6-dichlorfenolindofenolu. Pro plynovou chromatografii GC je nutné převedení askorbové kyseliny na trimethylsilylderivát, pro stanovení kyseliny dehydroaskorbové metylace po redukci pomocí H₂S. Nejvhodnější metodu je však HPLC s reverzní fází, tedy RP-HPLC. Nepolární stacionární fáze je většinou zastoupena uhlovodíky

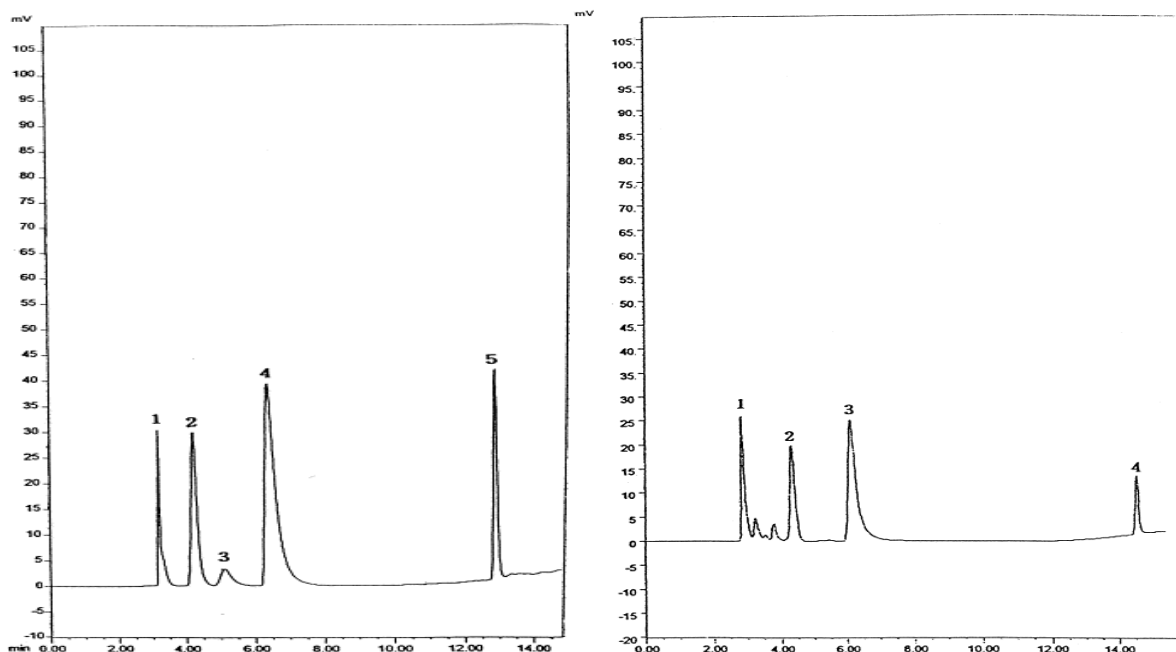
C4, C8 a C18 zakotvené na silikagelu. Pro zjištění obsahu vitamínu C ve vzorcích je nevhodnější používat detektory měřící absorpční v UV oblasti nebo elektrochemické detektory (ECD). Také zde není nutnost speciální úpravy vzorků (Jančář a Sichová 2005).

3.1.5 Příklady analytického stanovení vitamínu C metodou HPLC

Švýcarští vědci z katedry jakosti v Lausanne stanovili celkový obsah vitamínu C v obohacených (fortifikovaných) potravinách pomocí metody HLPC-UV. Tato metoda byla vyvinuta pro kvantifikaci celkového obsahu kyseliny askorbové (AA) a kyseliny isoaskorbové (isoAA). Důležitým krokem metody je kyselá extrakce AA v přítomnosti redukčního činidla TCEP (tris [2-karboxyethyl] fosfin) a tím je kyselina askorbová udržována ve své redukované formě. Separace byla provedena na koloně C18 a mobilní fází o složení octanu sodného (pH 5,4) s přídavkem TCEP a decylaminu. Výsledky byly detekovány UV detektorem. Mez detekce byla stanovena na 0,1 mg/100 g, relativní směrodatná odchylka a reprodukovatelnost byly stanoveny z hodnot 9 různých laboratoří a pohybovaly se mezi 2,0 % - 8,0 %. Metodu lze použít pro stanovení AA v různých typech potravinářských výrobků a zároveň pro kontrolu přítomnosti isoAA (Fontannaz et al., 2006).

V Jižní Korei stanovili vědci z tamní univerzity Inha současně všechny vitamíny rozpustné ve vodě, které byly vyloučeny lidskou močí po záměrném předávkování vitamínovými komplexy. Pro stanovení látek byla použita metoda HPLC s UV detekcí, oddělení látek probíhalo za gradientové eluce při poměru mobilní fáze 90/10 (v/v %) methanol / voda s 0,1% kyselinou trifluorocetovou (TFA). Separace byla uskutečněna na koloně typu MBondapak C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ) při pokojové teplotě. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 1 ml. min⁻¹. Vlnová délka detektoru byla nastavena na 254 nm. Vědci přišli na to, že po předávkování vitamíny roste rychle jejich koncentrace v moči až do maxima, které nastalo mezi 2 h – 3 h po aplikaci vitamínů. Poté koncentrace rychle klesá, viz obrázky 3. a 4.

Obrázek 3. Chromatogram vitaminů po aplikaci Obrázek 4. Chromatogram vitaminů po 3h



(1) vitamin C, (2) vnitřní standard, (3) vitamin B6, (4) vitamin B1, (5) vitamin B2
(Chan Mo et al., 2000).

Ve Španělsku v roce 2007 srovnávali vědci z Lleidské univerzity 2 metody HPLC při UV detekci. Při prvním pokusu byla použita kolona C18 s mobilní fází v podobě kyseliny sírové (0,01%) upravené na pH 2,6 a v druhém případě vědci použili kolonu s NH₂ fází a zvolili mobilní fází o složení fosfátový pufr (dihydrogenfosforečnan draselný) upravující pH na 3,5 spolu s acetonitrilem v poměru 60:40. V obou metodách byla detekce vitaminu při 245 nm. Byly použity také dva způsoby redukce rostlinného materiálu a to kvůli odlišení AA od isoAA. Jako první redukční činidlo zvolil tým vědců [DL-1,4-dithiotreitol (DTT) a druhé 2,3-dimerkapto-1-propanol (BAL). Ve výzkumu zkoušeli všechny možné typy analýz a to kombinací kolon spolu s redukčními činidly nebo bez nich. Z výsledku vyplynula jako nejlepší metoda ta, kde byla použita kolona C18 (mobilní fáze kyselina sírová) spolu s redukčním činidlem DTT. Tato metoda s uvedenými parametry se jeví pro analýzu vitaminu C v jahodách, jablkách a rajčatech jako nejlepší a nejjednodušší způsob, mez detekce byla stanovena při použití C18 kolony na 0,18 mg.100 g⁻¹, relativní směrodatná odchylka se pohybovala od 0,6 % do 3,9 % a výtěžnost mezi 93,6 % a 104,4 % (Odriozola-Serrano et al., 2007).

Jian-Ping Yuan a Feng Chen (1999) uvádějí ve své studii, že za použití dvou detektorů lze pomocí HPLC metody stanovit současně jak sacharidy, tak kyselinu askorbovou i furanové sloučeniny. Pro separaci byla zvolena kolona Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm),

mobilní fáze o složení acetonitril a 0,005M kyselina sírová (16:84, v/v %). Analýza sacharidů a alkoholických nápojů probíhala na refraktometrickém detektoru, naproti tomu kyselina askorbová byla stanovena pomocí detektoru s diodovým polem o zvolené vlnové délce 254 nm. Touto metodou byly stanoveny ovocné šťávy nealkoholické i alkoholické nápoje (Feng Chen and Jian-Ping, 1999).

Na pracovišti biologických a biochemických věd fakulty Chemicko-technologické v Pardubicích používají pro stanovení plazmatické hladiny vitamínu C metodu iontově-párovou HPLC s elektrochemickou detekcí. Pro separaci kyseliny askorbové z klinických vzorků byla použita kolona Discovery - C18, 150 x 4 mm (velikost částic 5 μm , Supelco), mobilní fáze o složení dihydrogen fosforečnan sodný, octan sodný, dodecyltrimetyl amonium chlorid, tetraoktyl amonium bromid, 15% metanol a pH mobilní fáze činilo 5,4. Průtok byl nastaven na hodnotu 0,5 ml.min⁻¹. Žáková (2003) uvádí, že vitamín C byl detekován pomocí elektrochemického detektoru Coulochem II (ESA). Potenciál na kanálu 1 analytické cely 5010 byl nastaven na -200 mV a na kanálu 2 na +300 mV. Citlivost byla 5 μA . Na ochranné cele 5020 měl hodnotu +350 mV. Analytická citlivost, přesnost a linearita byly dostačující.

3.2 SACHARIDY

Sacharidy jsou ve výživě člověka hlavním zdrojem energie potřebné pro normální činnost svalů a mozku, jsou také základními jednotkami některých buněk a chrání je před působením vnějších škodlivých vlivů (Clarková, 2000). Vyskytují se ve volné nebo vázané formě, např. glykoproteiny nebo glykolipidy. V organismu mohou částečně vznikat z glycerolu nebo aminokyselin. Přítomnost sacharidů ve stravě je nutná zejména kvůli zabránění odbourání tkáňových proteinů a rychlé oxidaci tuků spojené se vznikem ketoacidózy (Velíšek, 2002).

Sacharidy jsou velmi pestrá skupina látek, a proto je těžké je popsat jednoduchou definicí. Mohou mít strukturu polyhydroxy aldehydů, ketonů, alkoholů, kyselin, nebo mohou být také jejich jednoduchými deriváty a polymery (Čopíková, 1997).

Biologický význam sacharidů je mnohostranný, např. jsou stavebním materiálem pro všechny rostlinné buňky a tkáně, jsou důležitou složkou potravy a zdrojem energie živočichů a rostlin, tvoří klíčové sloučeniny pro biosyntézu proteinů a lipidů, jejich nemalé využití je i v medicíně jako léčiva a diagnostika. Kromě jmenovaných významných funkcí jsou sacharidy hojně využívány v chemickém, textilním, potravinářském a biotechnologickém průmyslu. Po vyčerpání běžných fosilních paliv lze se sacharidy počítat jako s perspektivními

a neustále se obnovujícími zdroji chemické energie a také jako se surovinami pro chemický průmysl.

Dle počtu sacharidových jednotek se sacharidy dělí na monosacharidy (jedna cukerná jednotka), oligosacharidy (dvě až deset monosacharidových jednotek) a nakonec polysacharidy (více než 10 monosacharidových jednotek). Mono- a oligosacharidy se někdy označují pod názvem cukry a to díky jejich sladké chuti a jejich společným vlastnostem (Černý a kol., 2010).

V lidské stravě by měly být sacharidy zastoupeny v počtu 50 - 60 % denního energetického příjmu, ale při redukci hmotnosti jen okolo 40 až 50 %. Jednoduché sacharidy (monosacharidy) jsou látky, které zvyšují produkci inzulínu a tím přispívají k následnému ukládání tuků, což může mít za následek rozvoj obezity. Mezi potraviny, které obsahují jednoduché sacharidy, patří například sladkosti, pečivo z bílé mouky a alkohol. Před těmito cukry je tedy lepší dát přednost složitým sacharidům (polysacharidům), neboť po jejich konzumaci se prudce nezvyšuje sekrece inzulínu a neukládá se tak přebytečný tuk. Mezi tyto potraviny patří celozrnné pečivo, ovoce, zelenina, mléko, brambory, atd. (Sullivan, 1999; Svačina a Bretšnajdrová, 2003).

3.2.1 Rozdělení sacharidů

Monosacharidy jsou látky z chemického hlediska chápány jako aldosity a ketosity, které ve své molekule obsahují pouze jednu cukernou jednotku a také dále podle počtu uhlíků v řetězci jsou děleny na triosy, tetrosy, pentosy a hexosy. Poslední zmíněné pentosy a hexosy se v přírodě vyskytují nejčastěji (Cejpek a Velíšek, 2008). Základní monosacharidy jsou odvozené od glycerinaldehydu nebo dihydroxyacetonu. Jsou to látky lineární povahy. Ve skutečnosti však existují monosacharidy převážně v cyklických strukturách hemiacetalové povahy a jsou heterocyklickými sloučeninami. Monosacharidy lze zapisovat Fischerovou nebo Haworthovou projekcí a díky tomuto schematickému znázornění jsme schopni vysledovat přítomnost chirálního uhlíku v jednoduchých cukrech. V praxi tato skutečnost znamená, že pro daný monosacharid existuje podle počtu chirálních uhlíků vždy určité množství konfiguračních isomerů (Černý a kol., 2010).

Müllerová (2003) řadí mezi hlavní monosacharidy lidské stravy glukosu (hroznový cukr), fruktosu (ovocný cukr) a galaktosu (součástí mléčného disacharidu laktózy).

Oligosacharidy jsou tvořeny dvěma až deseti monosacharidovými jednotkami, které jsou mezi sebou vzájemně pospojovány glykosidickými vazbami vzniknutými odštěpením

vody ze struktur cyklických monosacharidů. Oligosacharidy mohou být buď redukující, nebo naopak neredukující, což je zapříčiněno volnou poloacetalovou skupinou u redukujících cukrů. Neredukující cukry mají skupinu začleněnou v glykosidické vazbě. Podle počtu monosacharidových jednotek se dále oligosacharidy dělí na di-, tri-, tetra-, penta- až dekasacharidy. Monosacharidy se v oligosacharidech vyskytují ve formě pyranosy nebo furanosy, ale nejčastěji se objevují ve formě hexosy (Čopíková, 1997; Velíšek, 2002).

Mezi nejdůležitější oligosacharidy řadíme sacharózu, která je obsažena v cukrové řepě, třtině a je v naší stravě zastoupena z větší části. Sacharóza je neredukující cukr, který je složen z D-glukosy a D-fruktosy. Druhým neméně důležitým oligosacharidem je laktóza (D-glukosa a D-galaktosa), která je obsažena v mléce (Klimešová, 2006).

Polysacharidy jsou přírodní nebo syntetické makromolekuly složené z více než deseti monosacharidů či jejich derivátů, monosacharidy mohou být stejné nebo různé povahy a jsou opět spojeny glykosidickou vazbou do cyklické pyranosové formy. Počet jednotek se obvykle pohybuje okolo 100. Nejdůležitějšími stavebními jednotkami jsou D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa a D-fruktosa. Polysacharidy patří v přírodě k nejrozšířenějším sloučeninám a mají řadu velmi významných funkcí jako je stavební (celulosa, chitin), zásobní (glykogen, škrob) a také například ochrannou (gumy, slizy) (Černý a kol., 2010). Polysacharidy lze rozdělit na tři složky dle chemického složení a to na homoglykany (složené pouze z monosacharidů – glykogen, škrob, celulóza), nebo heteroglykany (2 nebo 3 různé stavební složky - heparin, kyselina hyaluronová) a poslední složené sloučeniny jako glykolipidy (lipidy s cukernou složkou v molekule) a glykoproteiny (proteiny s navázanou sacharidovou složkou) (Velíšek, 2002). V potravinářství jsou používány jako zahušťovadla a želírující látky, či jako arabská guma, algináty, karagenany, agar a pektin (Čopíková, 1997).

Dle Pánka a kol. (2002) se dají sacharidy dělit podle jejich funkce ve výživě:

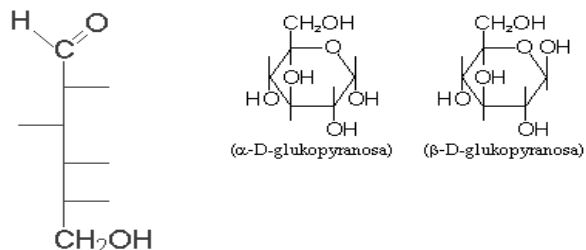
- A) Sacharidy využitelné - patří mezi ně většina monosacharidů (glukóza, fruktóza, ribóza), disacharidů (sacharóza, maltóza, laktóza), některých polysacharidů (škrob, dextriny, jaterní a svalový glykogen) a také deriváty sacharidů např. aminocukry, alkoholické cukry.
- B) Sacharidy špatně využitelné – za tyto látky se považují monosacharidy (xylóza, arabinóza), některé oligosacharidy (rafinóza, stachyóza – flatuentní látky v luštěninách) a také polysacharid inulin (inulinový sirup jako náhrada cukru pro diabetiky).
- C) Sacharidy nevyužitelné (balastní) – mezi balastní monosacharidy patří manóza a sorbóza, celulóza a hemicelulóza, dále také rezistentní škrob a pektiny.

Předložená diplomová práce je zaměřena na stanovení hlavních využitelných sacharidů v jablkách a mrkvích různé kvality. Mezi tyto cukry patří hlavně glukosa, fruktosa a sacharosa, a proto jim bude nadále věnována větší pozornost.

- Glukosa – (hroznový cukr), glukosa je tedy aldohexóza s jednou aldehydickou skupinou, viz obrázek 5. V ovoci a zelenině se vyskytuje v množství kolem 1 – 6 %, dále je obsažena v rostlinných šťávách, medu a krvi. Solitérně je glukosa bílá krystalická látka sladké chuti, dobře rozpustná ve vodě a lehce krystalizující, což se v potravinářství považuje za nežádoucí jev. Naopak jedním ze žádoucích jevů v potravinářství a konzervárenství je, aby potraviny obsahující tento monosacharid účinkem mikroorganismů dokázaly glukosu přeměnit na ethanol a kyselinu mléčnou. Glukosa je v organismu dobře vstřebatelná, stává se významným zdrojem energie pro organismy a podílí se také na stavbě mnoha důležitých oligosacharidů, jako jsou sacharosa, laktosa a z polysacharidů celulosa (Kodíček, 2012; Velíšek, 1999).

Obrázek 5. Chemická stavba glukosy

D-glukosa



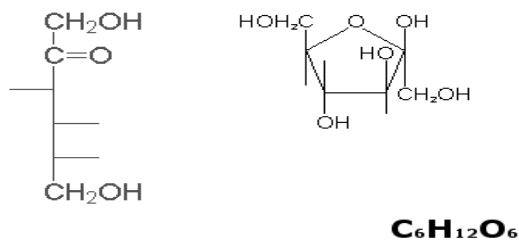
(Davidová, 2007)

- Fruktosa – obrázek číslo 6, jinak také nazývaná ovocný cukr, je nejsladším přírodním cukrem. Z těchto třech zmíněných sacharidů má právě fruktosa největší sladivost a je rychleji stravitelná než glukosa. Patří mezi nejrozšířenější ketohexosu s jednou ketoskupinou, která vykazuje redukční účinky. Všechny významné monosacharidy se v přírodě objevují v D konfiguraci a u fruktosy tomu není jinak. Jedinou změnou je však to, že otáčí rovinu polarizovaného světla vlevo, tudíž tedy název levulosa. Fruktosa se vyskytuje v rostlinných šťávách a medu, tvoří také, jak už bylo zmíněno spolu s glukosou disacharid

sacharosu a je nedílnou součástí glykolysy, glukogenese, pentosového a Calvinova cyklu jako meziprodukt při reakcích (Kodíček, 2012).

Obrázek 6. Chemická stavba fruktosy

D-fruktosa



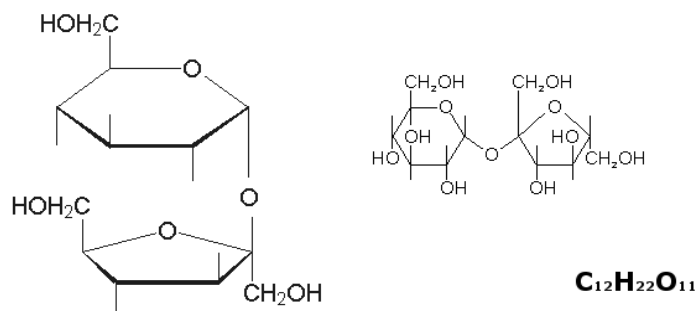
(Davidková, 2007)

- Sacharosa – získává se ze stébel cukrové třtiny nebo z bulev řepky cukrovky. Jejím synonymem je tedy také třtinový či řepný cukr. Sacharosu řadíme mezi neredukující cukry. Dokáže se velmi snadno hydrolyzovat na glukosu a fruktosu, což je označováno jako invertní cukr. Hydrolyza je podmíněna kyselým prostředím. Stejnou reakci může také vyvolat enzym sacharasa (nebo-li invertasa). Chemicky je sacharosa velmi nestabilní, je dobře rozpustná ve vodě, bod tání se pohybuje v rozmezí 182 °C až 192 °C. Ve všech zelených rostlinách se sacharosa stává důležitým metabolickým produktem sloužícím jako transportní sacharid. Důležité využití tohoto neredukujícího cukru se našlo v potravinářství a to jako sladidlo, nebo konzervační látka (např. pro marmelády) (Čopíková, 1997). Chemická stavba sacharosy je uvedena na obrázku 7.

Obrázek 7. Chemická stavba sacharosy

Sacharosa

beta-D-fruktofuranosyl-alfa-D-glukopyranosid



(Davidková, 2007)

Kopec (1998) ve svých tabulkách nutričních hodnot ovoce a zeleniny uvádí obsah sacharidů v jablkách 144 g.kg^{-1} a u mrkve je to hodnota 97 g.kg^{-1} . Složení sacharidů v čerstvých jablkách analyzovali také Suni a kol. (2000). Celkový obsah sacharidů byl stanoven na $615 - 716 \text{ g.kg}^{-1}$ v sušině, kdy byla z 57 % zastoupena dominantní fruktosa. Soria kol. (2009) stanovili obsah sacharidů obsažených v mrkvích kvantitativně metodou plynové chromatografie. Koncentrace fruktosy vykazovala hodnoty v rozmezí $20 - 244 \text{ mg.g}^{-1}$, glukosy $17 - 245 \text{ mg.g}^{-1}$ a sacharosy $137 - 689 \text{ mg.g}^{-1}$ sušiny.

3.2.2 Reakce sacharidů

Káš a kol. (2006) uvádí že, chemické reakce sacharidů jsou založeny na reaktivitě hydroxylových a karbonylových skupin a na schopnosti tvořit dehydratací minerálními kyselinami heterocyklický aldehyd furfural nebo jeho derivát.

Jednou z reakcí, která se děje i v našem trávicím systému je hydrolýza sacharidů. Jde o štěpení složitějších cukrů, jako je například sacharosa, na jednoduché cukry glukosu a fruktosu, načež se pro organismus stávají rychlým zdrojem energie. Hydrolýza se dělí na kyselou, kde je rozpad sacharidů způsoben kyselým prostředím, tepelným působením a alkalickým prostředím. Tato hydrolýza je také nazývána inverzí. Jako velká výhoda hydrolytické reakce se jeví její použití pro komerční výrobu škrobových sirupů (např. z kukuřice).

Další významnou reakcí sacharidů je jejich redukce, která probíhá působením redukčních podmínek nebo enzymatickým působením. Aldosy i ketosy mohou být zredukovány na polyhydroxyalkoholy, jinak také řečeno alkoholové cukry (alditoly). Obvykle se provádí reakce daného sacharidu s plynným vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru (nikl, palladium) (Alexander, 1998).

V neposlední řadě je důležitou reakcí oxidace sacharidů pro stanovení redukcí cukrů. Tato reakce je založena na redukcí účinku volné karbonylové skupiny. Aldehydová skupina aldosa se oxiduje na karboxyl a u ketos dochází k oxidaci spojené se štěpením řetězce. Sacharidy bez volné karbonylové skupiny takto nereagují. Vznikem karboxylové skupiny vznikají takzvané aldonové kyseliny (např. oxidací glukosy vznikne kyselina glukonová). Speciální oxidací alkoholové skupiny na šestém uhlíku aldosa vznikají uronové kyseliny. Nejběžnější zkouškou pro přítomnost redukcí cukrů je Fehlingova zkouška (Káš a kol., 2006).

Sacharidy jsou stabilní za normálních podmínek, pokud ale dojde ke zvýšení teploty, může dojít k nežádoucím reakcím, jako jsou třeba degradace na jiné sloučeniny či karamelizace, nebo dokonce reakce s jinými sloučeninami při Maillardově reakci, kdy sacharidy reagují s proteiny a aminokyselinami. Tato skutečnost zahrnuje také změnu sladivosti cukrů, která je nepostradatelná pro potravinářský průmysl (Alexander, 1998).

3.2.3 Analytické stanovení sacharidů

Pro stanovení monosacharidů (hlavně glukosy, fruktosy) a oligosacharidů (sacharosy, maltosy, laktosy) jsou významné reakce jejich funkčních skupin (-OH, -CHO, -CO) s chemickými činidly na barevné, oxidační nebo redukční produkty. Kromě kolorimetrických stanovení se také využívají fyzikálně-chemické, fyzikální (index lomu, optická otáčivost, NIRS nebo-li metoda blízké infračervené spektroskopie) a biologické vlastnosti (enzymatické vlastnosti). Pro stanovení jednotlivých cukrů se používají především separační metody jako kapalinová a plynová chromatografie.

3.2.3.1 Titrační metoda

Z titračních metod se nejběžněji využívá stanovení dle Bertrada, toto stanovení spočívá ve tvorbě oxidu měďného díky redukci Fehlingovým činidlem a následnou manganometrickou titrací, kdy se titruje do červeného zbarvení a výsledek je přepočítán na spotřebu manganistanu draselného. Další titrační metodou je Schoorleho metoda, ta je shodná s předchozí až po vyloučení oxidu měďného. Poté ale následuje jodometrické stanovení nezredukovaného Cu^{2+} po okyselení vzorku kyselinou sírovou. Titruje se thiosíranem sodným z šedomodrého zbarvení do krémového (Kubáň, 2007).

3.2.3.2 Denzitometrická metoda

Denzitometrické měření patří mezi fyzikální metody, přičemž se k měření používají přístroje jako hustoměr (sacharometr) a pyknometr. Pyknometr je standardizovaná nádoba o definovaném objemu při teplotě 20 °C vztaženo na specifickou hmotnost vody, touto nádobkou jsme schopni naměřit hmotnost objemové jednotky vzorku.

3.2.3.3 Refraktometrická metoda

Při metodě se stanoví index lomu vzorku při 20 °C a ten se poté dle tabulek převede na obsah sušiny. Vzorky se měří pomocí přístroje zvaného refraktometr.

Paprsek z monochromatického záření prochází rozhraním dvou transparentních prostředí, mění se tudíž rychlost a směr paprsku a díky tomu se láme. Index lomu je roven poměru rychlostí světla v těchto dvou prostředích (vzduch, analyzovaná látka) (Opekar a kol., 2002).

3.2.3.4 Polarimetrická metoda

Polarimetrická metoda se stejně jako refraktometrická řadí do metod optických, kdy základním principem je schopnost látek otáčet rovinu polarizovaného světla. Tyto látky se nazývají opticky aktivní (obsahují asymetrický uhlík). Mezi uvedené látky se svými vlastnostmi řadí také sacharidy. Měření je uskutečňováno pomocí přístrojů zvaných polarimetr a sacharimetr. Z technického hlediska jde o stejný přístroj, rozdíl spočívá v použitém zdroji záření a odlišné optické aktivitě analyzovaného vzorku. Sacharimetr už dle názvu slouží ke stanovení sacharosy ve vzorku a největší uplatnění tedy tato metoda nachází v cukrovarnictví a potravinářství (Klouda, 2003; Zýka, 1979).

3.2.3.5 Chromatografické metody

Pokud je zapotřebí stanovit ve vzorku jednotlivé cukry využívají se separační metody jako chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová (HPLC) a také plynová (GC) chromatografie. TLC byla převážně z větší části nahrazena novějšími metodami HPLC a GC, to díky jejich efektivní separaci, kvantifikaci a rychlosti stanovení analytu. Pokud půjde jen o kvalitativní analýzu vzorku, poté je volba TLC metody výhodná. Detekce rozdělených zón spočívá v napouštění tenké vrstvy roztoky činidel, které poté reagují s analyzovanými cukry za vzniku barevné reakce. Z intenzity zbarvení je možné spočítat koncentraci požadovaných sacharidů. Poměrně zřídka se také používá metoda GC a to kvůli nízké těkavosti cukrů, které je nutné převést na těkavější estery či ethery. V současné době je tedy v laboratořích pro stanovení mono- a disacharidů používána metoda HPLC. Jako nejvýhodnější se jeví iontová chromatografie (IC) s použitím kyseliny borité a komplexů sacharidů. Následná detekce je obvykle spektrofotometrická, elektrochemická nebo refraktometrická (Eliasson, 2006; Kubáň, 2007).

3.2.4 Příklady analytického stanovení metodou HPLC

Wilson et al. (1981) v časopise Journal of Food Science stanovili sacharosu, glukosu a fruktosu v bramborách pomocí HPLC metody. Systém HPLC se skládal z kolony typu μ Bondapak, mobilní fáze byla směsí acetonitrilu a vody v poměru 75 : 25, průtok mobilní

fáze činil $1,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Analyzované sacharidy byly vyhodnocovány refraktometrickým detektorem, a celková doba analýzy i s přípravou vzorku byla odhadnuta na 30 min. Výsledné hodnoty variačních koeficientů se pohybovaly v rozmezí 1,39 - 13,31 %.

Další HPLC metodu s refraktometrickou detekcí testovali v Itálii, ale tentokrát pro stanovení sacharosy, glukosy a fruktosy v mateří kašičce. Italští vědci vyhodnotili metodu jako dostatečně citlivou, dobře opakovatelnou, rychlou, jednoduchou a také vhodnou pro rutinní kontrolu kvality složení sacharidů v mateří kašičce. Metoda představuje i alternativu k plynovým chromatografickým metodám, které pro svou analýzu vyžadují složitější čištění a zpracování vzorků (Sesta, 2006).

Na pekingské univerzitě v Číně analyzovali současně pět sacharidů v potravinách (fruktosu, glukosu, sacharosu, maltosu, laktosu) s využitím ELSD detektoru. Jako kolona byla zvolena voda- NH_2 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm) vytemperovaná na 30 °C. Kolonou protékala mobilní fáze o složení 75 % voda ku 25 % acetonitrilu při průtokové rychlosti $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Celá analýza trvala necelých 20 min a koncentrace analytů se pohybovaly v rozmezí od 50 do 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Výtěžnost sacharidů z reálných vzorků představovala více než 80,3 % (Luo et al., 2010).

Velmi zajímavým výzkumem se zabývali Rahman a kol., kdy při stanovení glukosy a fruktosy pomocí HPLC metody použili místo refraktometrického detektoru (RI, který je při detekci sacharidů běžný) detektor DAD. Metoda byla provedena při nastavené vlnové délce 195 nm. Jako kolona byla zvolena Supelco Kromasil NH_2 (250mm x 4,5 mm, 5 mm), a aby nedocházelo k ucpání kolony, byla použita předkolona také od firmy Supelco. Kolona byla vytemperována na 30 °C. Mobilní fáze představovala směs acetonitrilu a deioizované vody (80 : 20) a složky se v koloně eluovaly při průtoku mobilní fáze $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Retenční čas fruktosy byl stanoven na 14,2 min a glukosy 16,25 min. Z výsledků tohoto výzkumu také vyplynulo, že detekci glukosy a fruktosy pomocí UV (195 nm) s použitím vody a acetonitrilu jako rozpouštědla je možno běžně používat v laboratorní praxi, neboť se metoda potvrdila jako statisticky spolehlivá (Rahman et al., 2008).

3.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE HPLC

Kapalinová chromatografie je obecný název pro procesy, při kterých se používá kapalná mobilní fáze (Weston, 1997). Podle pokusného uspořádání rozlišujeme chromatografii sloupcovou neboli kolonovou a chromatografii v plošném uspořádání, tedy papírovou nebo tenkovrstevnou (Mikeš, 1980). Kolonová kapalinová chromatografie je nejstarší ze všech chromatografických metod. Byla objevena Cvěttem již v roce 1906 (Cvet, 1906).

Vzhledem k pracnosti, zdlouhavému procesu a malé účinnosti tak zpočátku zůstávala na pokraji zájmu analytické chemie. Do popředí pozornosti se postupně dostávala až ve druhé polovině 20. století. V současnosti patří k progresivním, rychle se rozvíjejícím metodám, které nacházejí uplatnění nejen při analýzách potravin, ale i vzorků životního prostředí, ve farmaceutických laboratořích a celé řadě dalších oblastí (Štulík, 2004).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je vhodná zejména pro analýzy méně těkavých, tepelně nestabilních, ale i vysokomolekulárních látek zejména organických, ale i některých anorganických (Opekar a kol., 2002).

HPLC se řadí mezi separační metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé, vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fází, která je plněna do chromatografické kolony, bývají částice kulovitého tvaru. Jsou buď homogenního kulového charakteru jako např. silikagel, případně sestávající z nosiče, který je pokryt chemicky navázanou fází, jako jsou např. nejčastěji používané fáze typu C18, C8, kyano, amino a další. V posledních letech nacházejí uplatnění stacionární fáze tvořené částicemi s pevným jádrem, které skýtají řadu výhod (Microsol, 2012).

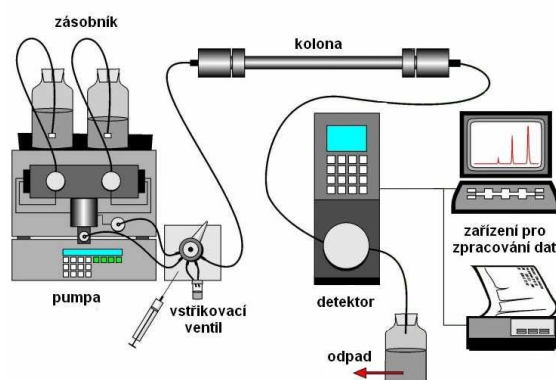
Mobilní fází bývá rozpouštědlo, častěji směs rozpouštědel. Podmínkou pro dobrou separaci je požadavek, aby analyzované látky byly v mobilní fází dobře rozpustné. Podle vlastností stacionární a mobilní fáze dělíme analýzy na systém normálních (NP) nebo reverzních fází (RP). V prvním případě je v koloně naplněn sorbent polárního charakteru a mobilní fáze je tvořena nepolárním rozpouštědlem s malým množstvím polárnějšího rozpouštědla. Systém RP využívá nepolární stacionární fáze a polárního rozpouštědla jako fází mobilní. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem, proto je tato metoda označována jako vysokotlaká kapalinová chromatografie. HPLC lze využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu (Cvačka, 2011).

Mezi výhody při optimalizaci podmínek analýzy patří široká nabídka HPLC kolon, možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, využití gradientové eluce vedle

jednoduché eluce izokratické, volba teploty kolony, ale i možnost volby vhodného detektoru (Klouda, 2003). Na mobilní fázi jsou kladeny vysoké požadavky z hlediska čistoty, nízké viskozity, chemické inertnosti, stanovené analyty v ní musí být dobře rozpustné a dále i kompatibilní s detektorem (Helán, 2005; Štulík, 2004).

3.3.1 Instrumentace HPLC metody

Obrázek 8. Schéma přístroje pro HPLC



(Störmann, 2003)

Moderní kapalinový chromatograf na obrázku číslo 8 se skládá ze zásobníků mobilní fáze s odplyňovacím systémem, pístových čerpadel, manuálního nebo automatického dávkování vzorku, chromatografické kolony, detektoru a vyhodnocovacím systémem. Části, které přicházejí do kontaktu se vzorkem nebo mobilní fází, musí být vyrobeny z inertních materiálů, jako je nerez, PEEK (polyetheretherketon), případně teflon (polytetrafluoroethylene). Tím se zabraňuje nežádoucí kontaminaci vzorku (Cvačka, 2010).

A. Chromatografické kolony a předkolony:

Volba vhodné kolony je v HPLC velmi důležitá. Účinnost separace závisí na typu použitého sorbentu, na délce kolony, vnitřním průměru i vnitřním povrchu kolony. Důležitá je i volba předkolony, případně předkolumnové frity, či filtru. Nejpoužívanější materiály k výrobě kolon jsou nerezová ocel, případně PEEK (polyetheretherketon) (Douša, 2008).

Klasické HPLC kolony jsou dlouhé 50 – 300 mm a jejich vnitřní průměr je 2 – 5 mm. Velikost částic bývá běžně 3 nebo 5 μm , v některých případech i menší. Čím je kolona delší,

tím se zvyšuje účinnost separace, ale roste také doba potřebná k provedení analýzy a separace probíhá za vyššího tlaku (Štulík, 2004).

Stacionární fáze:

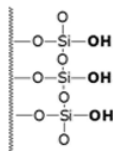
Stacionární fáze dělíme podle charakteru na polární a nepolární, podle struktury na celopórézní částice s pevným jádrem, případně monolytické kolony (Coufal, 2004).

- Polární adsorbenty:

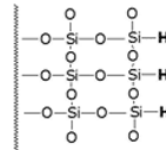
Nejrozšířenějším zástupcem polárních fází je silikagel. Povrch silikagelu je slabě kyselý, takže zadržuje více bazické látky než látky kyselé a neutrální. Hodnota pH mobilní fáze nesmí nepřesáhnout 8, jinak dochází k nežádoucímu rozpouštění silikagelu (Douša, 2008). Speciálním typem silikagelu je tzv. Silica TYPE-C, který umožňuje díky patentované struktuře, kde jsou silanolové skupiny Si-OH nahrazeny nepolárními skupinami Si-H použití i vodné mobilní fáze. Výrobcem tohoto typu sorbentu je firma Microsolv Technologies (Microsolv, 2012). Srovnání obou typů silikagelu je na obrázku 9.

Obr 9. Srovnání obou typů silikagelu

Klasický silikagel



Silikagel TYPE-C



Dalším, méně častým polárním sorbentem používaným v HPLC je oxid hlinitý (Alumina). Vedle hydroxylových skupin jsou na jeho povrchu centra s elektron-akceptorovými vlastnostmi, které mohou vstupovat do interakce s molekulami bohatými na elektrony. Pro chromatografii se nejlépe hodí neutrální oxid hlinitý (Helán, 2005).

Další, podstatně více používané fáze normálního charakteru jsou chemicky vázané polární stacionární fáze: aminopropyl, kyanopropyl, diol, pentafluorfenylpropyl, případně nitrofenyl (Šebela, 2012). Pentafluorfenylpropylová fáze je vhodná zejména pro donor/akceptorové interakce s vhodným analytem. Vykazuje vyšší selektivitu vůči aromatickým solutům. Na těchto fázích je možné používat až 100% vodné mobilní fáze v rozmezí pH 2,0 - 8,0 do teplot až 70 °C (Douša, 2008).

- Chemicky vázané nepolární stacionární fáze

Stacionární fáze chemicky vázané na nosiči jsou výhodné zejména proto, že u nich nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče ani k rozpouštění v mobilní fázi, jsou odolné i vůči změně teploty. Stacionární chemicky vázané fáze etherového typu -Si-O-C mají charakter monomerů. Tento typ vazby není stabilní vůči hydrolyze, proto v mobilní fázi nesmí být přítomna voda. Stacionární chemicky vázaná fáze typu -Si-N-C je stabilnější k hydrolyze, je použitelná při pH 4 až 7,5. Zcela odolné vůči hydrolyze je třetí typ vazby -Si-O-Si-C (Nollet, 1992).

Reakcí silanolových skupin Si-OH za specifických podmínek mohou být připravovány stacionární fáze s různými typy ligandů, které se vyznačují různou polaritou a tím i rozdílnou selektivitou (C8, C18, fenyl, alkylfenyl) (Vávrová, 2012).

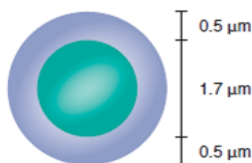
Na nepolárních fázích jsou retenční časy polárních látek velmi krátké, retenční časy nepolárních látek rostou se vzrůstající délkou ligandu (alkylového řetězce) a celkovým obsahem chemicky vázaného uhlíku (Šebela, 2012).

Nežádoucí zbytkové polární silanolové skupiny na nepolárních fázích mohou interagovat s analytem i mobilní fází, což negativně ovlivňuje separaci. Dochází ke chvostování píků. K eliminaci těchto nežádoucích vlastností fáze se používá několik způsobů úprav, tzv. endcappingu (Douša, 2008). Jedná se o fyzikálně-chemický proces, který redukuje počet volných silanolových skupin na nepolární fázi buď chemickou reakcí nebo stericím stíněním volných OH skupin, modifikací ligandu, případně začleněním polární skupiny do organického uhlíkového řetězce stacionární fáze mezi povrch silikagelu a nepolární vrstvy (Tatarkovičová, 2012, pers. Comm.).

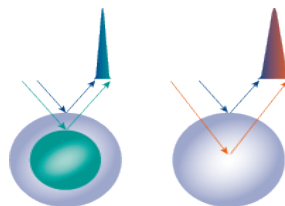
Některé nevýhody stacionárních fází připravovaných na bázi silikagelu (rozpuštnost v alkalické oblasti pH) odstraňují polymerní stacionární fáze, připravené zpravidla na bázi styrendivinylní benzenových kopolymerů. Tyto polymerní stacionární fáze jsou použitelné v celém rozsahu pH, což je jejich velká výhoda (Helán, 2005).

Specifickou skupinu stacionárních fází tvoří částice s pevným jádrem. Pro ilustraci je na obrázku 10 uvedena struktura částice s pevným jádrem a na obrázku 11 je schematicky znázorněno, jak se liší šířka píku v chromatogramu získanému při analýze na koloně plněné částicemi s pevným jádrem a celoporézními částicemi.

Obrázek 10. Struktura částice s pevným jádrem 2,7 μm



Obrázek 11. Srovnání šířky píků



(Labicom, 2012)

Kolony s těmito fázemi se vyznačují výbornou reprodukovatelností různých výrobních šarží, vykazují vysoké rozlišení v krátkém retenčním čase při zachování nízkého tlaku. Délka analýz na těchto kolonách se oproti kolonám klasickým zkracuje až 10x. Další výhodou je vynikající teplotní i pH odolnost v silně kyselých i bazických oblastech. Tento typ stacionární fáze se vyrábí v různých modifikacích. Délka kolon bývá od 50 do 150 mm, vnitřní průměr od 2 do 4,6 mm. Jsou plněny částicemi $< 2 \mu\text{m}$, velikost pórů bývá 90 Å. Vybrané typy jsou použitelné i v systémech UHPLC. (Advanced Materials Technology, 2013; Cvačka, 2011).

Při snížení průměru částic pod $2 \mu\text{m}$ už standardní tlakový limit 40 MPa nestačuje, proto byla na trh uvedena nová generace kapalinově chromatografické instrumentace, označovaná jako UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) nebo UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography), umožňující pracovat při vyšším tlaku (Čáslavský, 2010). UPLC a UHPLC lze považovat za synonyma, jelikož technologii UPLC uvedla poprvé na trh firma Waters, která si zkratku UPLC ochránila jako „trade mark“, obecně se pro tuto technologii, přístroje a kolony dalších výrobců přijalo společné označení UHPLC (Jurková a Olšovská, 2012).

UPLC je novější alternativou klasické HPLC metody. Analýzy probíhají za vysokých tlaků – 15 000 psi (1000 bar, 100 MPa), případně až 18 000 psi. Tyto podmínky přinášejí řadu předností, jako jsou např. kratší doba analýzy a tím i vyšší produktivita, snižuje se spotřeba rozpouštědel, zvyšuje se separační účinnost, dochází ke snížení meze detekce a zvýšení citlivosti (Douša, 2009). Maximální průtoková rychlost je 5 ml/min, používají se chromatografické kolony s částicemi $< 2 \mu\text{m}$. Tím že došlo ke změně geometrie chromatografické kolony (délky a vnitřního průměru) a zmenšením částic sorbentu dochází

k výraznému zvýšení citlivosti metody. UPLC kolony jsou 5 až 10 cm dlouhé a s průměrem nejčastěji 2,1 nebo 1 mm. Používají se sorbenty anorganického (silikagel) nebo organického typu (polymer, uhlík) (Háková, 2012).

B. Detektory:

Důležitou součástí chromatografů jsou detektory, které sledují složky vycházející z kolony. Výsledkem analýzy je záznam chromatografické separace tzv. chromatogram. Ve spojení s kapalinovou chromatografií se používají univerzální (např. UV/VIS), ale i selektivní detektory (např. fluorescenční). Mohou být destruktivní nebo nedestruktivní. Pro vícenásobnou detekci je lze kombinovat a řadit je za sebou (Opekar a kol., 2002).

Typy HPLC detektorů:

- fotometrický UV/VIS – nejčastěji používaný selektivní detektor, který může pracovat při určité vlnové délce, nebo mohou být vlnové délky v průběhu analýzy měněny. UV/VIS detektory vykazují širokou oblast lineární odezvy na změnu koncentrace (Mikeš, 1980).

- spektrofotometrický detektor s diodovým polem (DAD) – poskytuje trojrozměrný záznam. Odezva detektoru v závislosti na čase je doplněna současným snímáním absorpčního spektra (Opekar a kol., 2002).

- fluorimetrický (FLD) – velmi citlivý selektivní detektor použitelný pro látky přímo fluoreskující nebo fluoreskující po derivatizaci. Fluorescence se měří ve směru kolmém k paprsku primárního záření (Coufal, 2004).

- refraktometrický (RI) – založen na měření indexu lomu. Detektor je tím citlivější, čím větší je rozdíl mezi indexem lomu analytu a rozpouštědla. RI detektor nelze použít při gradientové eluci. Důležitá je skutečnost, že index lomu závisí na teplotě (Klouda, 2003).

- detektor ELSD – je univerzální detektor, který slouží k detekci látek neobsahujících ve své molekule žádný chromofor nebo fluorofor. Při vstupu eluentu do zmlžovače dojde k jeho zmlžení inertním plynem, zpravidla dusíkem. Míha eluentu následně vstupuje do evaporační komůrky, kde dojde k odpaření mobilní fáze a vytvoření částic méně těkavého solutu. V optické komůrce dojde k rozptylu světla pocházejícího ze zdroje záření na částicích solutu a odezva fotodetektoru je pak přímo úměrná hmotě procházející optickým paprskem (Opekar a kol., 2002).

- hmotnostně-spektroskopický (MS) - je univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor, který umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter. Detekuje ionty, které vznikají určitým typem ionizace analytů. Jedná se například o elektrickou (EI) nebo chemickou ionizaci (CI), ionizaci rychlými ionty (SIMS), desorpční fotoionizaci (MALDI), využití termospreje (TS) nebo elektrospreje (ES), případně dalšími způsoby. Prvním krokem v hmotnostním detektoru je převod analytů rozpuštěných v mobilní fázi na ionty v plynné fázi. Dále se ionty analyzují, určuje se poměr hmotnosti ku náboji (m/z) (Nollet, 1992).

V současnosti je na trhu několik typů hmotnostních detektorů, jejichž principy se vzájemně odlišují. Jedná se například o hmotnostní detektory s jednoduchým nebo trojitým kvadrupólem, detektor pracující na principu iontové pasti nebo průletového analyzátoru TOF (Time-of-Flight), Q-TOF (Quadrupole Time-of-Flight), MALDI-TOF a řada dalších. Volba konkrétní varianty závisí zejména na charakteru prováděných analýz (Cajka a kol., 2008).

V praxi jsou ve spojení s HPLC výjimečně používány i další typy detektorů, jako jsou například AAS, FTIR, vodivostní detektor, aerosolový detektor nabitých částic, radiometrický detektor a další (Nollet, 1992).

Stanovení sacharidů se nejčastěji provozovalo na HPLC systému s RI detekcí. Jako výhody refraktometrické detekce se uvádí vysoká lineární odezva, ale naopak její nevýhodou je nízká citlivost, nemožnost použití chromatografie s gradientovou elucí. Proto se v současné době více využívá HPLC ve spojení s ELSD detektorem, kdy je citlivost o řád vyšší než u RI detektoru a je kompatibilní s gradientovou elucí (Rogatsky et al., 2005).

3.3.2 Analytické vyhodnocení chromatogramu

Výsledkem analýzy vzorku metodou kapalinové chromatografie je chromatogram. V nejjednodušším případě se jedná o závislost signálu detektoru na čase – např. při použití UV/VIS detektoru (Klouda, 2003).

Pro kvalitativní analýzu (identifikaci látek) se v kapalinové chromatografii využívá zejména shody retenčních časů sledovaného analytu se standardem.

Retenční (eluční) čas t_R představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce. Je odečítán z chromatogramu jako vzdálenost mezi okamžikem nástřiku a maximem příslušného chromatografického píku. Hodnoty retenčního času jsou udávány většinou v minutách nebo sekundách.

Redukovaný retenční čas ($t'R$) - čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi.

Potom platí: $t'R = tR - tM$

Mrtvý čas kolony tM - vyjadřuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce složky, která není zadržovaná stacionární fázi a pohybuje se stejnou rychlostí jako tok mobilní fáze.

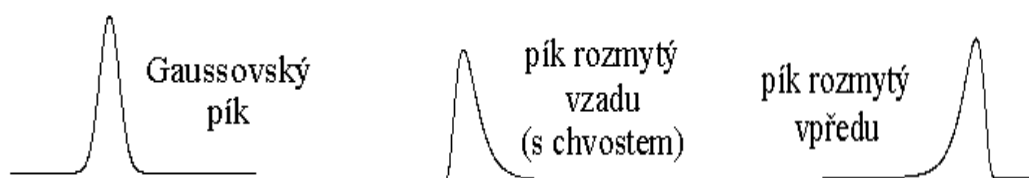
Retenční (kapacitní) faktor (k) - definován jako poměr redukovaného retenčního času ku mrtvému retenčnímu času. $k = t'R / tM$

(Opekar a kol., 2002)

Úkolem kvantitativního stanovení je nalezení vztahu mezi plochou, výjimečně výškou píku a množstvím eluované látky. Platí, že metoda, která byla použita pro vyhodnocení plochy standardu, musí být použita i pro vyhodnocení plochy stanovované látky. Pro kvantitativní vyhodnocení chromatografických dat je využíváno různých typů software. Každý z nich obsahuje řadu způsobů integrace, který je pak možné zvolit k optimalizaci integračních událostí. Při analýzách reálných vzorků jsou využívány metody eliminující v maximální možné míře nepřesnosti, ke kterým může dojít při úpravě, zpracování i vlastní analýze vzorku. Pro vyhodnocení lze využít metodu vnějšího standardu, metodu standardního přídatku, metodu vnitřního standardu nebo metodu vnitřní normalizace. Vždy se snažíme volit pokud možno co nejpřesnější a nejjednodušší metodu vyhodnocování (Klouada, 2003).

Pro kvantitativní vyhodnocení je vhodné charakterizovat několik důležitých pojmů, které je nutno při vyhodnocení respektovat. Ideální pro kvantitativní vyhodnocení je symetrický tvar píku, tzv. Gaussovský tvar (obr. 12 A). Pokud nejsou správně zvoleny podmínky HPLC analýzy, může docházet k deformaci tvaru píku (obr. 12 B, C). V tomto případě je nutno upravit podmínky separace.

Obrázek 12. Tvary píku v chromatogramu

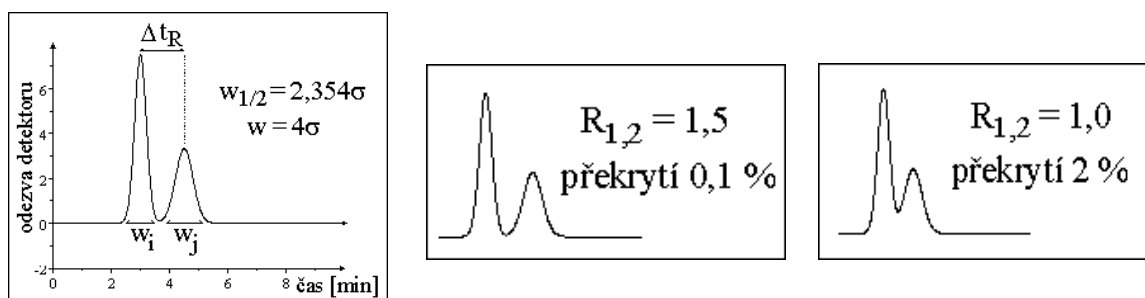


(Coufal, 2004)

Účinnost chromatografické kolony charakterizuje, do jaké míry se zóny separovaných látek na koloně rozšiřují. Mírou účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických pater dané kolony a výškový ekvivalent teoretického patra.

Rozlišení charakterizuje míru relativní separace popř. míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Na obr. 13 jsou uvedeny příklady různého rozlišení.

Obrázek 13. Příklady různého rozlišení



(Coufal, 2004)

Pro kvantitativní vyhodnocení jsou důležité také pojmy jako citlivost, což je směrnice kalibrační křivky, linearita, mez detekce (LOD – limit of detection), případně mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification), které spolu velmi úzce souvisí.

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie

Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Běžně se mez stanovitelnosti uvádí jako desetinásobek šumu základní linie.

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma proměnnými, tj. odezvou detektoru a koncentrací analytu. V současné době se k hodnocení linearity používá téměř výhradně korelační koeficient. Závisí na rozložení bodů na přímce.

Správnost metody je definována jako stupeň, do jakého stanovená hodnota analytu ve vzorku odpovídá dané referenční hodnotě.

Přesnost metody vyjadřuje shodu mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem přesně definovaných podmínek. Přesnost se vyjadřuje jako směrodatná odchylka respektivě jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Základním požadavkem je skutečnost, aby se RSD co nejvíce blížila nule.

Interval spolehlivosti je interval, ve kterém s vysokou, předem zvolenou pravděpodobností leží hodnota hledaného parametru (Čůta, 1986; Opekar a kol., 2002).

3.4 NUTRIČNÍ JAKOST EKOLOGICKÉ SUROVINY VERSUS INTEGROVANÁ SUROVINA

Vzhledem k rostoucímu významu bezpečnosti potravin a zvyšujícímu se šetrnému přístupu k životnímu prostředí, je stále důležitější a častější ekologická produkce. Ekologické zemědělství se snaží eliminovat používání zemědělských chemikálií a použít přírodní materiály a to jak v přípravcích na ochranu rostlin, tak také v lidské výživě. Bioprodukty mají mnohem nižší množství reziduí pesticidů ve srovnání s integrovanou nebo konvenční produkcí (Róth et al., 2007).

V současné době je velmi diskutovanou otázkou, zda je kromě šetrnějšího přístupu k životnímu prostředí také vyšší nutriční kvalita bio produktů oproti integrovanému pěstování. A zda existují doložitelné důkazy a studie, jestli tomu tak doopravdy je.

Weibel a kol. v roce 2000 testovali odrůdu jablka Golden Delicious. Pěstovali současně 5 párů organických/integrovaných jablek v podobném mikroklimatu a jejich maximální vzdálenost činila 180 km. Při měření vnitřní kvality jablek zkoumali následující parametry: pevnost, obsah sacharidů, kyselinu jablečnou, minerální prvky, fenoly, selen, vlákninu, vitamin C a E. Byla také provedena senzorická analýza. Jako výsledek studie uvádějí, že všechny ovocné vzorky organických sadů měly výrazně pevnější dužninu plodu a měly také vyšší chuťové známky než konvenční. Bio jablka obsahovala více fosforu a fenolických látek. Tyto výsledky poukazují na to, že organicky pěstovaná jablka mohou mít vynikající vnitřní kvalitu. Nicméně, pro zobecnění výsledku by byla zapotřebí rozsáhlejší studie.

Ve třech různých regionech Belgie byly sebrány odrůdy jablka Janagold, v každém kraji byly odebrány odrůdy z organické a integrované produkce se stejnými klimatickými a půdními vlastnostmi. Ovoce bylo uloženo po dobu 6 měsíců v ochranné atmosféře. Určená doba skladování experimentu měla simulovat podmínky v obchodním řetězci. Jakostní parametry (pevnost, obsah kyselin a sacharidů, aroma profilu) byly analyzovány ihned po sklizni a skladování. Analýza neprokázala fakt, že existuje přesvědčivý důkaz rozdílu v obsahu živin mezi ekologickým a konvenčním přístupem k pěstování a také uvádí, že veřejnost nedokáže snadno rozlišit organické výrobky od těch konvenčních (Róth et al., 2007).

V roce 2002 byl proveden výzkum ve srovnání organických a konvenčních druhů potravin, který se přímo zabýval nutriční kvalitou (hlavně vitamin C) a také toxicitou (pesticidy a nitráty) u různých druhů ovoce a zeleniny. Při experimentu byl analyzován rozdíl v konkrétních vnitřních a vnějších parametrech kvality organických a konvenčních jablek

odrůdy Golden Delicious. Významné rozdíly byly zjištěny u obsahu kyselin a také u objemu a barvy odrůdy. Naopak žádný rozdíl nebyl zjištěn u sacharidů, pH, sušiny a pevnosti jablka. Při tomto výzkumu byl uveden závěr, že existují rozdíly mezi ekologickými a konvenčními potravinami pouze pro některé parametry, ale kvalita je ovlivněna i jinými faktory. Jako jsou odrůda, podnebí, typ půdy a podmínky skladování (Bordeleau, 2002).

Rembialkowska (2003) se zabývala studií ekologického zemědělství jako systému, který poskytne lepší rostlinné kvality produktů. Ekologické zemědělství je obvykle považováno za systém zlepšující kvalitu zeleniny. Cílem její studie bylo analyzovat dopady ekologických metod na kvalitu zeleniny během výroby, skladování a na cestě ke spotřebiteli. Analýza byla provedena pro nutriční a senzorické parametry kvality mrkví a brambor z ekologického zemědělství, které byly srovnávány s kvalitou konvenčních protějšků. Bylo zjištěno, že organická zelenina měla nižší výnosy, ale většina jejich nutričních a smyslových atributů jakosti byla lepší než u běžných plodin. Nižší úroveň dusičnanů a zároveň vyšší obsah vitamínu C v organických bramborách by mohla mít významný anti-karcinogenní vliv na lidský organismus. Biozelenina dokáže také snadněji splnit potřeby pro kojeneckou výživu a stravu malých dětí.

Zdá se, že jedním z hlavních důvodů pro nákup biopotravin je dojem zákazníků, že potraviny jsou výživnější než konvenční. S ohledem na rostoucí zájem o bio produkty, je nutné přezkoumat a určit, do jaké míry je očekávání spotřebitelů splněno. Existuje jen málo studií, které jsou schopny doložit plnohodnotné srovnání, a proto je obtížné zobecnit a uvést závěr, že ekologické potraviny mají lepší kvalitu. Přes tyto omezení, se však mohou některé rozdíly vyskytovat. Např. existuje mírná tendence k vyšším obsahům kyseliny askorbové v organicky pěstovaných bramborách a listové zelenině. S ohledem na zbytek živin a dalších kvalitativních parametrů jsou stávající důkazy nedostatečné. Konečné experimenty, kde byla zvířata krmena organickým krmivem, ukazují, že zdraví zvířat a jejich reprodukční schopnost se mírně zlepšila. Podobné zjištění ale nebylo dosud identifikováno u člověka (Magkos et al., 2003).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 STANOVENÍ SUŠINY U OVOCE A ZELENINY

Sušina byla stanovena u všech odrůd jablek a mrkví pomocí sušících vah typu Precisa HA 300 od výrobce Precisa Instruments AG, Switzerland. Navážka každého ze vzorků činila 1 g s přesností na jednotky miligramů. Na sušících vahách byl navolen program pro stanovení sušiny ovoce a zeleniny. Sušení vzorků probíhalo při teplotě 105 °C, kdy celý sušící program trval přibližně 20 min. Čas analýzy byl závislý na obsahu vody ve vzorku a výsledek byl uveden procentuálních hodnotách. Každá odrůda vzorku byla proměřena třikrát a spolu s hodnotami jsou v tabulkách číslo jedna a dvě uvedeny i příslušné směrodatné odchylky.

4.2 STANOVENÍ VITAMINU C

4.2.1 Použitý materiál

Analýza vitamínu C byla prováděna na sedmi odrůdách jablek, z nichž každá odrůda byla v bio (ekologické) a nebio (integrované) variantě. Jmenovitě to byly odrůdy **Florina**, **Zvonkové**, **Topaz**, **Šampion**, **Ontario**, **Melrose** a **Idared**. Jablka z certifikované ekologické produkce byla původem z Radimi a Luže u Chrudimi. Jabloně měly vyšší kmenné tvary a tento sad obhospodařuje Ekofarma Bílý mrak se sídlem v Šachově. Druhá skupina stejných odrůd a to tedy integrovaných byla z produkce ze sadu zákrsků a vřeten ČZU na Suchdole. Byly to především starší, ale dosud pěstované odrůdy. Velmi důležitým parametrem pěstování bylo také to, že na obou stanovištích byla v loňském roce (2012) vyrovnaná, velmi dobrá násada plodů.

Analýza vitamínu C byla provedena na osmi typech mrkví, které byly odlišně pěstovány. Pokusy byly realizovány na Demonstrační a výzkumné stanici v Praze Troji (detašované pracoviště katedry zahradnictví – Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů v Praze). Jmenovitě byly pěstovány dvě odrůdy mrkví, Afalon F1 a Cortina F1. Jejich výsev byl uskutečněn v květnu 2012 a sklizeň proběhla v říjnu 2012. Hustota porostu činila buď 600 tis. rostlin/ha, nebo 900 tis. rostlin/ha, kdy byly vysévány ve dvojřádcích se vzdáleností mezi řádky ve dvojřádku 10 cm. Každá odrůda byla pěstována v integrované produkci (intenzita hnojení 80 kg/ha) a také v ekologické produkci

(1,5 t Organica/ha). Konečné rozdělení a pojmenování všech typů mrkví bylo následující: **ITA 600** (Integrovaný/ Troja/ Afalon F1) pěstovaný při hustotě 600 tis. rostlin/ha ve čtyřech opakováních, stejný typ je **ITA 900**, který byl ale vypěstován při hustotě 900 tis. rostlin/ha. Dalším typem jsou mrkve typu **ITC 600** a **ITC 900** (Integrovaný/ Troja/ Cortina F1). Jako jejich ekologický protějšek byly stanovovány odrůdy mrkví s názvem **ETA 600**, **ETA 900** (Ekologický/ Troja/ Afalon F1) hustota pěstování 600 a 900 tis. rostlin/ha a také ve čtyřech opakováních. Dále pak **ETC 600**, **ETC 900** (Ekologický/ Troja/ Cortina F1).

4.2.2 Použité pomůcky a přístroje

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- filtrační papír Filtrak 388, 15 cm
- injekční stříkačky (objem 10 µl)

Přístroje

- analytické váhy AND ER-180A (A and D Company, Tokyo Japan)
- ultrazvuková lázeň (Tesla, Czech republic)
- pH metr Snail Instruments pH 12
- ruční mixér B-515M (500W) FAGOR (Electrodomésticos, Spain)
- HPLC systém INGOS skládající se z:
 - pumpa LCP 5020
 - analytická kolona LiChroCart 125-4 Purospher Star RP-18e (5 µm), teplota kolony 25 °C
 - spektrofotometrický detektor LCD 5000, vlnová délka 254 nm
 - průtok mobilní fáze 1 ml.min⁻¹

4.2.3 Použité chemikálie

- demineralizovaná destilovaná voda
- Kyselina askorbová (Penta s.r.o. Chrudim)
- Kyselina metafosforečná 85% (Lachema Neratovice)
- Methanol p.a. (Lach-Ner s.r.o. Neratovice)
- Kyselina fosforečná 85% (Lachema Neratovice)

4.2.4 Příprava roztoků k analýze

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním 760 ml destilované vody spolu s 40 ml methanolu. Pro upravení hodnoty pH na 3 byla přidána také kyselina fosforečná a to v nepatrném množství (0,2 μ l). Takto připravená mobilní fáze byla v zásobní láhvi odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu přibližně deseti minut.

Příprava extrakčního činidla

Pro extrakci standardů a vzorků byl použit 3% roztok kyseliny metafosforečné, který byl připraven rozpuštěním 15 g pevné kyseliny metafosforečné v 500 ml demineralizované vody.

Příprava standardních roztoků

Než bylo postupně připraveno deset standardních roztoků ve zvyšující se koncentraci, byl nejprve namíchán zásobní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 mg/ml v extrakčním činidle. Maximální doba použitelnosti zásobního roztoku i standardů činila pouze jeden den. Standardy sloužily ke zjištění a stanovení retenčních časů vitamínu C a také pro odezvu detektoru příslušné koncentrace. Z naměřených hodnot byla dále sestrojena kalibrační přímka, pomocí níž byly počítány koncentrace reálných vzorků. Pro stanovení kalibrační přímky kyseliny askorbové byly sestrojeny standardy o koncentracích 0,01; 0,02; 0,04; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 a 2,5 mg/50 ml. Do 50 ml odměrných baněk bylo tedy postupně pipetováno 0,005 ml; 0,01 ml, 0,02 ml, 0,05 ml, 0,15 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, 1 ml a 1,25 ml zásobního standardního roztoku kyseliny askorbové. Poté byly odměrné baňky doplněny po značku extrakčním činidlem. Z takto připravených standardů byla odebrána část roztoku injekční stříkačkou a poté aplikována do smyčky HPLC přístroje.

Kalibrační křivka pro vitamin C, viz obrázek 14, byla sestavena z výše popsaných standardních roztoků, které měly postupnou zvyšující se koncentraci. Každý z těchto standardů byl proměřen 3krát. Kalibrační křivka je závislostí odezvy detektoru na koncentraci roztoku. Detekce vitamínu byla stanovena v retenčním čase 1,80 min.

4.2.5 Příprava vzorků

Všechny plody byly před vlastní analýzou očištěny a zbaveny částí, které se nekonzumují, vzorky byly zprvu nahrubo nakrájeny, byl vybrán reprezentativní vzorek a ten následně rozmixován na jemnou drť, která byla poté zamrzána při -18 °C. Následně byla drť

jablek a mrkví před analýzou rozmražena a na vahách bylo naváženo do 100 ml odměrné baňky 10 g vzorku s přesností na jednotky miligramů. Poté se do baňky doplnilo po rysku extrakční činidlo a takto připravený vzorek byl vložen na 5 min do ultrazvukové lázně a následně ještě jednu minutu třepán pro důkladnou extrakci vitamínu C. Získaný extrakt byl přefiltrován přes filtrační papír a výsledný filtrát byl injekční stříkačkou dávkován do smyčky HPLC přístroje. Analýza jednoho vzorku trvala 5 min.

4.3 STANOVENÍ SACHARIDŮ

4.3.1 Použitý materiál

Byl použit stejný materiál jako u stanovení vitamínu C, viz kapitola 4.2.1.

4.3.2 Použité pomůcky a přístroje

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- filtrační papír Filtrak 388, 15 cm
- filtr Simplepure NY 0,45 μm
- injekční stříkačky (objem 10 ml)

Přístroje

- analytické váhy AND ER-180A (A and D Company, Tokyo Japan)
- ultrazvuková lázeň (Tesla, Czech republic)
- ruční mixér B-515M (500W) FAGOR (Electrodomésticos, Spain)
- HPLC systém Varian Star 9010 skládající se z:
 - pumpa Varian 9010
 - smyčka Rheodyne při objemu nástřiku 20 μl
 - analytická kolona Aminex HPX- 87H, 300 mm na 7,8 mm, teplota kolony 55 $^{\circ}\text{C}$
 - refraktometrický detektor Varian RI-4, pracovní teplota 35 $^{\circ}\text{C}$
 - průtok mobilní fáze 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

4.3.3 Použité chemikálie

- demineralizovaná destilovaná voda
- D(+) glukosa, monohydrát p.a. (LABCHEMA Brno)
- D(-) fruktosa (KEBO Lab)
- Sacharosa p.a. (Lach-ner s.r.o. Neratovice)
- 96% H₂SO₄ p.a. (Penta s.r.o. Chrudim)

4.3.4 Příprava roztoků k analýze

Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi u stanovení sacharidů metodou HPLC tvořil 0,005M roztok kyseliny sírové, který byl připraven smícháním 0,5585 ml 96% kyseliny sírové spolu s 2 l demineralizované vody. Takto připravená mobilní fáze byla v zásobní láhvi odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu přibližně deseti minut.

Příprava standardních roztoků

Pro každý sacharid byly postupně připraveny čtyři standardní roztoky ve zvyšující se koncentraci. Standardy sloužily ke zjištění a stanovení retenčních časů daného sacharidu a také pro odezvu detektoru pro příslušnou koncentraci. Z naměřených hodnot byla dále sestrojena kalibrační přímka, pomocí níž byly počítány koncentrace reálných vzorků. Pro stanovení kalibrační přímky glukosy, fruktosy a sacharosy byly sestrojeny standardy o koncentracích 0,25; 0,5; 1; 1,5 g/50 ml, které byly připraveny smícháním přesně naváženého množství příslušného sacharidu spolu s demineralizovanou vodou, ta byla doplněna po rysku 50 ml odměrné baňky. Roztok byl důkladně promíchán do úplného rozpuštění. Z takto připravených standardů byla odebrána část roztoku injekční stříkačkou a poté aplikována do smyčky HPLC přístroje.

Každý standard o jedné koncentraci byl pomocí metody proměřen 2krát. Kalibrační přímka je závislostí plochy píku na koncentraci roztoku. Retenční čas u analýzy sacharidů této metody byl stanoven pro sacharosu 8,088 min, pro glukosu 9,62 min a pro fruktosu 10,45 min.

4.3.5 Příprava vzorků

Všechny plody byly před vlastní analýzou očištěny a zbaveny částí, které se nekonzumují, vzorky byly zprvu nahrubo nakrájeny, byl vybrán reprezentativní vzorek a ten následně rozmixován na jemnou drť, která byla poté zamrazena při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byla drť jablek a mrkví před analýzou rozmrazena a na vahách bylo naváženo do 250 ml kádinky 30 g vzorku s přesností na jednotky miligramů. Poté byla do každé z kádinek dovážena demineralizovaná voda do 60 g a vše bylo důkladně promícháno. Následovala první filtrace vzorku pomocí filtračního papíru, získaný filtrát byl převeden do 50 ml kádinky a pomocí injekční stříkačky s filtrem Simplepure NY $0,45\text{ }\mu\text{m}$ podruhé zfiltrován. Poté byl injekční stříkačkou dávkován do smyčky HPLC přístroje a analýza jednoho vzorku trvala 15 min.

4.4 POUŽITÝ SOFTWARE

Výsledky, grafy, tabulky, směrodatná odchylka, interval spolehlivosti a aritmetický průměr byly sestrojeny a vypočteny pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

Statistická průkaznost stanovená Tukeyho testem byla vyhotovena pomocí softwaru Statistica 10 (StatSoft Inc.)

5. VÝSLEDKY

5.1 STANOVENÍ SUŠINY V PLODECH JABLEK A MRKVÍ

Výsledné hodnoty sušiny jablka znázorňuje tabulka č. 1, v níž jsou zaneseny tři hodnoty sušiny a následně průměr těchto hodnot u každé ze sedmi odrůd jablek a odlišném způsobu pěstování. V tabulce č. 2 jsou uvedeny čtyři hodnoty sušiny pro obě odrůdy mrkví, zvlášť pak pro hustotu 600 a 900 i pro odlišný typ produkce.

Tabulka 1. Výsledné hodnoty sušiny jablka

	1. měření (%)	2. měření (%)	3. měření (%)	Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka
IDARED I.P.	9,28	9,53	10,09	9,63	s= 0,34
IDARED BIO	13,35	13,53	13,60	13,49	s= 0,11
MELROSE I.P.	12,65	12,67	12,51	12,61	s= 0,07
MELROSE BIO	15,73	16,17	15,94	15,95	s= 0,18
ONTARIO I.P.	17,61	17,32	17,29	17,41	s= 0,14
ONTARIO BIO	13,47	13,49	13,67	13,54	s= 0,09
ŠAMPION I.P.	13,39	13,34	13,38	13,37	s= 0,02
ŠAMPION BIO	15,56	15,96	15,42	15,65	s= 0,23
TOPAZ I.P.	15,51	15,11	15,43	15,35	s= 0,17
TOPAZ BIO	14,67	14,23	14,32	14,41	s= 0,19
ZVONKOVÉ I.P.	13,39	13,70	13,51	13,53	s= 0,13
ZVONKOVÉ BIO	14,36	14,49	14,73	14,53	s= 0,15
FLORINA I.P.	13,42	13,61	13,71	13,58	s= 0,12
FLORINA BIO	13,86	13,56	13,57	13,66	s= 0,14

Tabulka 2. Výsledné hodnoty sušiny mrkví

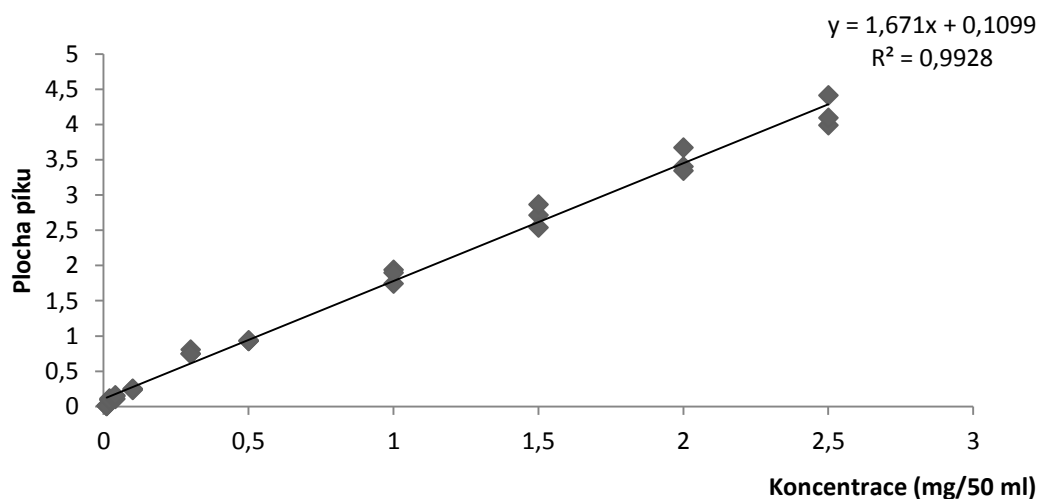
	1. opakování (%)	2. opakování (%)	3. opakování (%)	4. opakování (%)	\bar{x}	Směrodatná odchylka
ETA 600	11,20	11,79	10,55	9,75	10,82	s= 0,76
ETA 900	9,55	11,45	11,54	10,43	10,74	s= 0,81
ITA 600	15,72	14,25	13,86	13,74	14,39	s= 0,79
ITA 900	13,34	14,06	13,64	13,13	13,54	s= 0,35
ETC 600	13,17	12,80	13,56	12,10	12,91	s= 0,54
ETC 900	12,32	14,60	13,75	13,64	13,58	s= 0,82
ITC 600	11,86	10,86	12,57	10,65	11,49	s= 0,78
ITC 900	14,21	14,07	12,87	12,45	13,40	s= 0,76

5.2 VALIDACE METODY

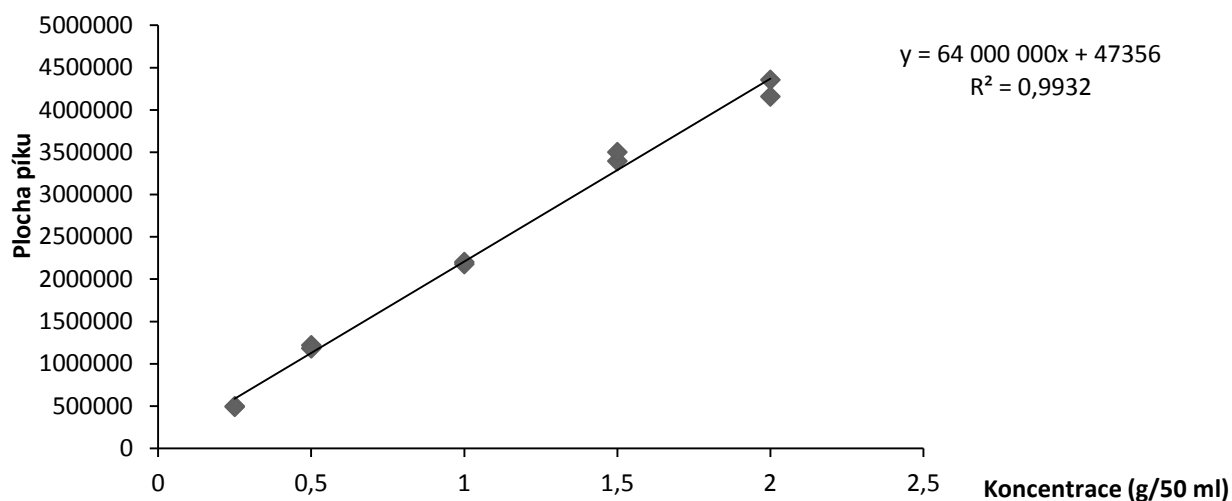
5.2.1 Sestrojení kalibračních křivek

Pro validaci metody byly pro kyselinu askorbovou připraveny standardní roztoky od koncentrace 0,02 do 5 mg.100 g⁻¹. Pro sacharosu, glukosu a fruktosu pak hodnoty od 0,5 do 3 g.100 g⁻¹. Tyto standardní roztoky byly zaneseny do kalibračních přímek, které jsou znázorněny na obrázcích 14, 15, 16 a 17.

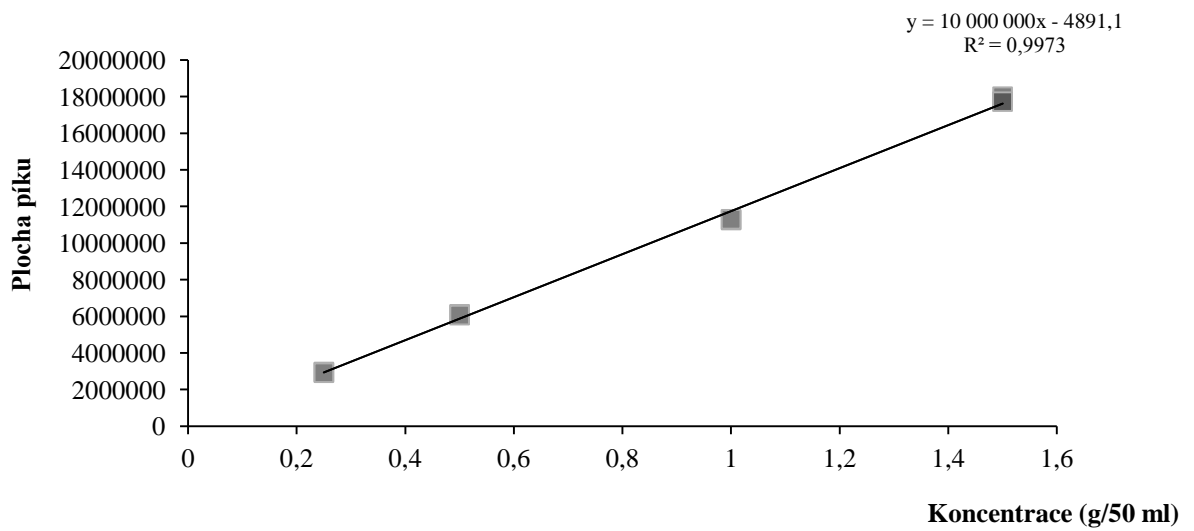
Obrázek 14. Kalibrační křivka vitamínu C



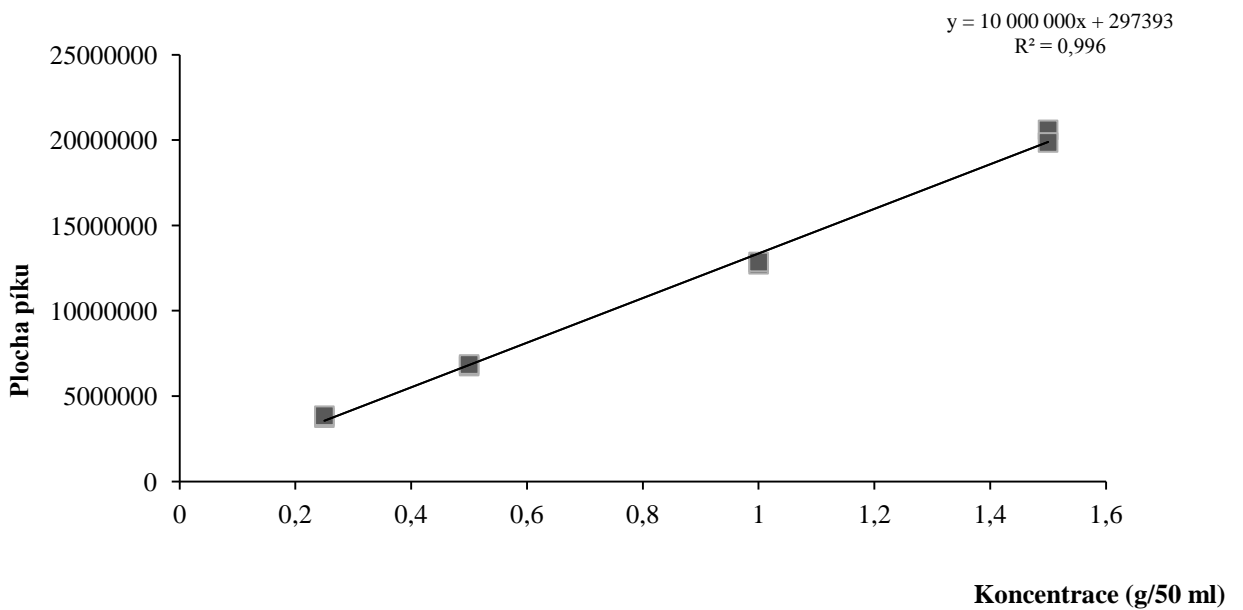
Obrázek 15. Kalibrační křivka sacharosy



Obrázek 16. Kalibrační křivka glukosy



Obrázek 17. Kalibrační křivka fruktosy



Odezva detektoru na zvyšující se koncentrace standardů byla lineární, kdy korelační koeficient R byl u vitamínu C roven hodnotě 0,9928, u sacharosy to pak bylo 0,9932, glukosa měla hodnotu 0,9973 a nakonec fruktosa (0,996).

Mez detekce pro kyselinu askorbovou byla stanovena na $0,33 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, pro sacharosu $1,11 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, hodnota meze detekce glukosy byla $0,27 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ a poslední hodnota pro fruktosu činila $0,25 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Dalším ukazatelem je mez stanovitelnosti, která byla stanovena pro kyselinu askorbovou $1,11 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, sacharosu $3,71 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, glukosu $0,89 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, fruktosu $0,83 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Oba ukazatele mezí byly stanoveny dle Douši (2008), jako první byl určen šum, který byl posléze vynásoben hodnotou 3 (pro mez detekce), nebo hodnotou 10 (pro mez stanovitelnosti) a vydělen hodnotou směrnice kalibrační přímky (kde je v závislosti výška píku na koncentraci standardních roztoků).

Přesnost naměřených hodnot je vyjádřena pomocí směrodatných odchylek, u každého jablka ze 3 výsledných hodnot u mrkve pak ze 4 hodnot. Pro přesný výsledek by se měla směrodatná odchylka co nejvíce blížit nule.

Přesnost metody byla stanovena paralelním měřením jednoho vzorku, který byl navážen, zfiltrován a proměřen desetkrát stejnou metodou. Směrodatná odchylka (SD) byla $0,22 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kyselina askorbová), $0,01$ (sacharosa), $0,28$ (glukosa), $0,07 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (fruktosa). Interval spolehlivosti (IS) pak $\pm 0,14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (kyselina askorbová), $\pm 0,01$ (sacharosa), $\pm 0,17$ (glukosa) a $\pm 0,04 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (fruktosa).

Správnost metody, která je definována jako stupeň shody deklarované a naměřené hodnoty u referenčního certifikovaného materiálu. Tento validační parametr nebyl proměřen, neboť referenční materiál nebyl k dispozici.

5.3 STANOVENÍ VITAMINU C V PLODECH JABLEK A MRKVÍ METODOU HPLC

5.3.1 Stanovení vitamínu C u reálných vzorků vybraných odrůd jablek

Každá odrůda jablek byla proměřena třikrát, výsledná koncentrace je tedy průměrem 3 analýz. Pomocí kalibrační rovnice byla vypočtena odpovídající koncentrace vzorku v nástřiku a následně byla vypočítána koncentrace v původním vzorku.

Koncentrace kyseliny askorbové u všech sedmi odrůd jablek v bio kvalitě byla stanovena jako hodnota menší než mez stanovitelnosti $1,11 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. U jablek z integrované produkce (I.P.) byl obsah vitamínu C u odrůd Topaz, Zvonkové a Florina taktéž

menší než mez stanovitelnosti. Naměřené koncentrace u zbývajících odrůd jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Výsledná koncentrace vitamínu C odrůd Topaz, Zvonkové, Florina

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (mg.kg ⁻¹)			Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.			
Topaz	I.P.	35,2	16,8	24,9	25,6	7,5	± 8,5
Zvonkové	I.P.	37,3	35,4	67,5	46,7	14,7	± 16,6
Florina	I.P.	15,5	30,9	11,3	19,2	8,4	± 9,5

5.3.2 Stanovení vitamínu C u reálných vzorků vybraných odrůd mrkví

Analýza každé z odrůd byla provedena čtyřikrát, protože dané typy mrkví byly pěstovány ve čtyřech opakováních. Zvlášť jsou také uvedeny hodnoty ekologické a naopak integrované produkce a rozdíly u hustoty rostlin. Dále byl postup stejný jako u stanovení vitamínu C u jablek.

Koncentrace kyseliny askorbové u obou odrůd mrkví v hustotě 900 rostlin na hektar, dále také u odrůdy Cortina ekologické produkce a odrůdy Aftalon integrované produkce, byla hodnota menší než mez stanovitelnosti 1,11 mg.100 g⁻¹. V tabulce číslo 4 je uvedena koncentrace vitamínu C u zbylých analyzovaných vzorků, kde byla hodnota koncentrace vyšší.

Tabulka 4. Výsledná koncentrace vitamínu C odrůdy ETA 600, ITC 600

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (mg.kg ⁻¹)				Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.	4.			
Aftalon	ET (600)	198,0	112,0	103,0	184,0	149,0	42,2	± 41,3
Cortina	IT (600)	60,6	109,0	89,2	93,2	88,0	17,5	± 17,1

(ET) Ekologická produkce, (IT) Integrovaná produkce, (600) rostlin/ ha, (900) rostlin/ ha

5.4 STANOVENÍ SACHARIDŮ V PLODECH JABLEK A MRKVÍ METODOU HPLC

5.4.1 Stanovení sacharidů u reálných vzorků vybraných odrůd jablek

Výpočet koncentrace v původním vzorku byl proveden stejně jako u vitamínu C, viz kapitola 5.3.1. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách číslo 5, 6 a 7.

Tabulka 5. Výsledné koncentrace sacharosy u analyzovaných odrůd jablek

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)			Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.			
Idared	I.P.	121	113	107	114	5,7	± 6,5
Idared	BIO	133	113	127	124	8,4	± 9,5
Melrose	I.P.	40	48	47	45	3,6	± 4,0
Melrose	BIO	50	37	43	43	5,3	± 6,0
Ontario	I.P.	13	15	15	14	0,9	± 1,1
Ontario	BIO	4	4	3	4	0,5	± 0,5
Šampion	I.P.	49	46	45	47	1,7	± 1,9
Šampion	BIO	75	87	76	79	5,4	± 6,2
Topaz	I.P.	231	244	237	237	5,3	± 6,0
Topaz	BIO	212	159	183	185	21,7	± 24,5
Zvonkové	I.P.	54	57	54	55	1,4	± 1,6
Zvonkové	BIO	29	25	25	26	1,9	± 2,1
Florina	I.P.	174	162	150	162	9,8	± 11,1
Florina	BIO	42	42	42	42	0,0	± 0,0

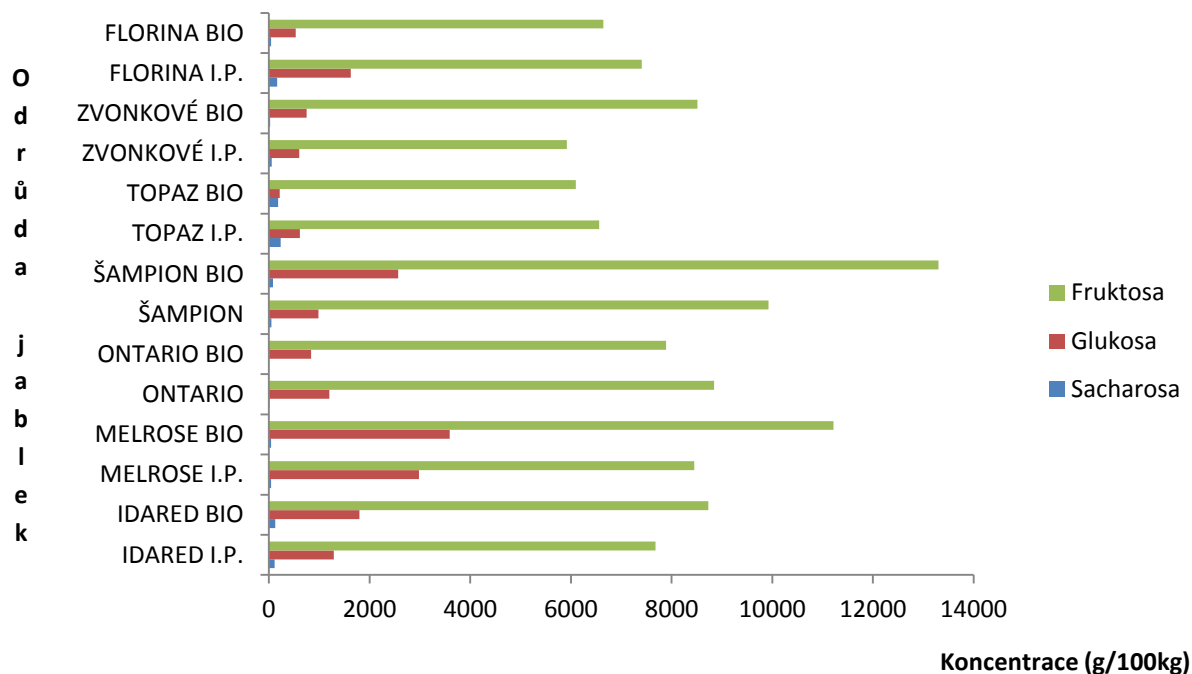
Tabulka 6. Výsledné koncentrace glukosy u analyzovaných odrůd jablek

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)			Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.			
Idared	I.P.	1 382	1 282	1 199	1 288	74,8	± 84,7
Idared	BIO	1 963	1 573	1 868	1 801	166,1	± 187,9
Melrose	I.P.	2 927	3 089	2 931	2 982	75,4	± 85,4
Melrose	BIO	3 616	3 671	3 479	3 589	80,7	± 91,4
Ontario	I.P.	1 270	1 177	1 163	1 203	47,5	± 53,7
Ontario	BIO	949	760	800	836	81,3	± 92,0
Šampion	I.P.	1 063	1 113	777	984	148,0	± 167,5
Šampion	BIO	2 636	2 579	2 493	2 569	58,8	± 66,5
Topaz	I.P.	677	573	603	618	43,7	± 49,5
Topaz	BIO	263	173	209	215	37,0	± 41,9
Zvonkové	I.P.	517	637	650	601	59,9	± 67,8
Zvonkové	BIO	633	783	827	748	83,1	± 94,0
Florina	I.P.	1 643	1 610	1 620	1 624	13,8	± 15,6
Florina	BIO	570	590	443	534	65,1	± 73,7

Tabulka 7. Výsledné koncentrace fruktosy u analyzovaných odrůd jablek

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)			Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.			
Idared	I.P.	7 990	7 697	7 355	7 681	259,5	± 293,6
Idared	BIO	9 291	7 349	9 551	8 730	982,5	± 1111,8
Melrose	I.P.	8 298	8 717	8 342	8 452	188,0	± 212,8
Melrose	BIO	10 792	12 732	10 137	11 220	1 101,0	± 1245,9
Ontario	I.P.	10 640	7 206	8 692	8 846	1 406,0	± 1591,0
Ontario	BIO	8 186	7 701	7 781	7 889	212,3	± 240,2
Šampion	I.P.	10 305	9 821	9 660	9 929	274,1	± 310,2
Šampion	BIO	13 826	13 424	12 652	13 301	487,2	± 551,3
Topaz	I.P.	6 532	6 565	6 581	6 559	20,4	± 23,1
Topaz	BIO	6 196	6 173	5 923	6 097	123,6	± 139,9
Zvonkové	I.P.	5 780	6 286	5 697	5 921	260,3	± 294,6
Zvonkové	BIO	8 225	8 730	8 595	8 517	213,5	± 241,6
Florina	I.P.	7 416	7 655	7 153	7 408	205,0	± 231,0
Florina	BIO	6 646	7 005	6 280	6 644	296,0	± 334,9

Graf 1. Výsledné stanovení koncentrace sacharidů u všech odrůd jablek



Z grafu č. 1 je patrné, že u všech odrůd je v nejvyšším počtu obsažena fruktosa, dále pak glukosa a nejméně je zastoupena sacharosa. Z porovnávaných vzorků měla nejvyšší obsah sacharidů odrůda Šampion BIO a naopak nejnižší hodnota byla naměřena u odrůdy Topaz BIO.

5.4.2 Stanovení sacharidů u reálných vzorků vybraných odrůd mrkví

Výpočet koncentrace v původním vzorku byl proveden stejně jako u vitamínu C, viz kapitola 5.3.2. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 8, 9 a 10 viz níže.

Tabulka 8. Výsledné koncentrace sacharosy u analyzovaných odrůd mrkví

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)				Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.	4.			
Aftalon	ET (600)	150	117	63	47	94	41,3	± 40,5
Aftalon	ET (900)	24	25	28	25	26	1,5	± 1,5
Aftalon	IT (600)	38	36	45	58	44	8,6	± 8,4
Aftalon	IT (900)	36	26	26	35	31	4,8	± 4,7
Cortina	ET (600)	47	40	42	34	41	4,7	± 4,6
Cortina	ET (900)	56	63	38	58	54	9,4	± 9,3
Cortina	IT (600)	34	23	11	4	18	11,5	± 11,2
Cortina	IT (900)	60	46	40	29	44	11,2	± 11,0

Tabulka 9. Výsledné koncentrace glukosy u analyzovaných odrůd mrkví

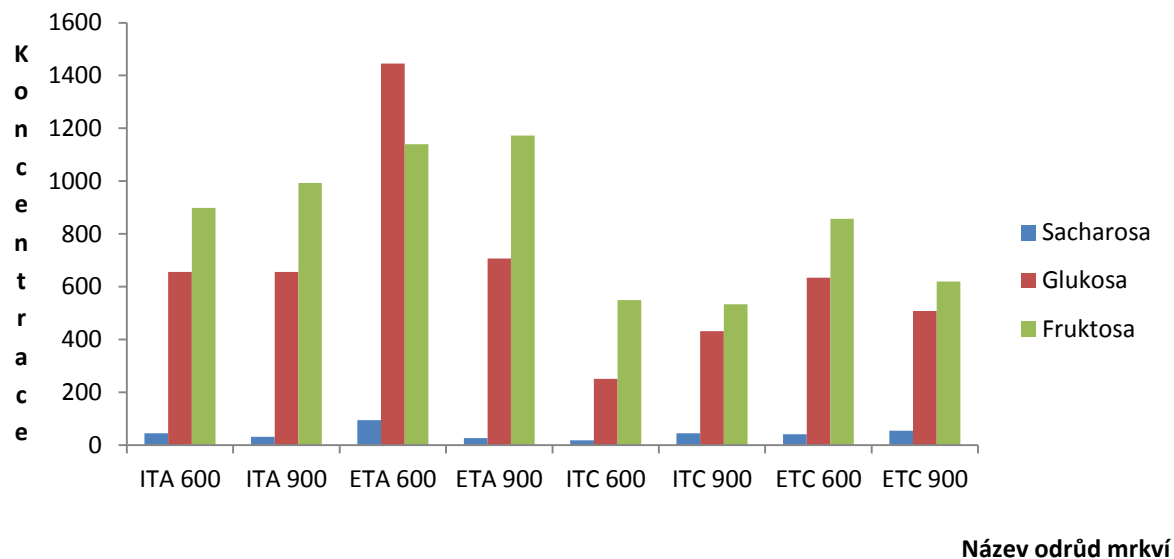
Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)				Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.	4.			
Aftalon	ET (600)	2 041	1 558	867	1 312	1 445	424,2	± 415,7
Aftalon	ET (900)	706	696	795	631	707	58,4	± 57,2
Aftalon	IT (600)	1 119	604	482	417	656	276,0	± 270,4
Aftalon	IT (900)	627	533	633	829	656	107,7	± 105,6
Cortina	ET (600)	594	671	688	584	634	45,8	± 44,9
Cortina	ET (900)	477	499	615	439	508	65,7	± 64,4
Cortina	IT (600)	271	244	180	309	251	47,1	± 46,1
Cortina	IT (900)	506	485	267	467	431	95,8	± 93,9

Tabulka 10. Výsledné koncentrace fruktosy u analyzovaných odrůd mrkví

Odrůda	Způsob pěstování	Koncentrace vitamínu C (g.100 kg ⁻¹)				Průměr \bar{x}	Směrodatná odchylka	Interval spolehlivosti
		1.	2.	3.	4.			
Aftalon	ET (600)	1 730	1 452	774	605	1 140	465,2	± 455,8
Aftalon	ET (900)	1 144	1 089	1 404	1 056	1 173	136,9	± 134,1
Aftalon	IT (600)	921	1 143	870	659	898	172,1	± 168,7
Aftalon	IT (900)	928	751	1 023	1 271	993	187,7	± 184,0
Cortina	ET (600)	922	927	847	730	857	79,6	± 78,0
Cortina	ET (900)	441	537	935	562	619	188,1	± 184,3
Cortina	IT (600)	540	514	434	707	549	99,4	± 97,4
Cortina	IT (900)	594	598	264	675	533	158,5	± 155,3

(ET) Ekologická produkce, (IT) Integrovaná produkce, (600) rostlin/ ha, (900) rostlin/ ha

Graf 2. Výsledné stanovení koncentrace sacharidů u všech odrůd mrkví



V grafu číslo dva je uveden celkový obsah sacharidů u všech typů mrkví. Z tohoto grafu lze odvodit nejvyšší hodnotu sacharidů a tu vykazovala mrkev s označením ETA 600. Tedy odrůda Aftalon F1 z ekologické produkce. Odrůda ETA 600 se také od ostatních analyzovaných vzorků liší nejvyšším obsahem glukosy, která je dokonce vyšší než obsah fruktosy, jenž převažuje u všech zbývajících odrůd. Naopak nejnižší hodnota sacharidů vycházela pro odrůdu z integrované produkce ITC 600. V konečném výsledku při srovnání všech typů mrkví je nejvíce zastoupena fruktosa, poté glukosa a v nejnižším počtu sacharosa, což odpovídá stejnému zastoupení jako u analyzovaných jablek.

6. DISKUZE

Stěžejní částí předložené diplomové práce bylo validovat a optimalizovat HPLC metodu pro stanovení kvalitativních parametrů, jako jsou obsah sacharidů a kyseliny askorbové, v různých odrůdách jablek a mrkví v bio a nebio podobě. Stanovit u nich sušinu, a v neposlední řadě porovnat vnitřní kvalitu ekologických produktů oproti produktům integrovaným, která byla doložena a statisticky zhodnocena Tukeyho testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebo $\alpha = 0,01$ (95% či 99% statistická průkaznost).

Výsledky stanovení sušiny u odrůd jablek jsou o něco nižší, než uvádí Kopec (1998). U mrkví se hodnoty sušiny s literaturou shodují. Dle výsledků této práce není statisticky průkazný rozdíl mezi obsahem sušiny u bio a integrovaných jablek (hladina průkaznosti $p = 0,1361$). U mrkví nebyla stanovena průkaznost rozdílu mezi odlišnou hustotou rostlin na hektar (600/900) ($p = 0,4485$) a také mezi odrůdou Aftalon a Cortina ($p = 0,3911$). Mezi sušinou ekologické a integrované produkce mrkví je 95% statisticky průkazný rozdíl ($p = 0,0232$) pro vyšší hodnotu sušiny z mrkví integrované produkce. Prugar (2000) stanovil, že u obsahu sušiny (vážkově i refraktometricky), obsahu celkových cukrů (mono-, di-sacharidů), organických kyselin, vitaminů (B1, B2, C) a minerálních látek nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly mezi ekologickým a konvenčním systémem pěstování. Výsledky experimentální části práce s literárními se tedy shodují.

Důležitým krokem bylo sestavení kalibrační přímky u obou stanovovaných parametrů s dostatečnou přesností. Dle korelačního koeficientu R, který se blíží hodnotě + 1, lze odvodit, že linearita kalibrační funkce byla zachována a hodnoty splnily požadovanou přesnost pro následující analýzu reálných vzorků. HPLC metoda se pro stanovení vitamínu C a sacharidů v ovoci a zelenině projevila jako metoda přesná a spolehlivá. Výsledky validace předložené práce se shodují i s vědeckými údaji. Např. výzkum ze Španělska od vědců Odriozola-Serrano et al. (2007), kteří ohodnotili metodu HPLC s UV detekcí pro stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině jako spolehlivou, rychlou a metodu s vysokou výtěžností. Dále výzkum týmu vědců Wilson et al. (1981) a Sesta (2006) poukazuje na přesnost, spolehlivost, dobrou opakovatelnost a rychlost HPLC metody s RI detekcí pro stanovení glukosy, fruktosy a sacharosy v zelenině, ovoci a mateří kašičce.

Koncentrace kyseliny askorbové u všech sedmi odrůd jablek v bio kvalitě byla stanovena jako hodnota menší než mez stanovitelnosti použité metody. V nebio (integrované produkci) kvalitě jablek byl taktéž obsah vitamínu stanoven na hodnotu menší než mez stanovitelnosti, ale pouze u čtyř ze sedmi odrůd. Odrůda TOPAZ I.P. (nebio) měla výsledný obsah kyseliny askorbové v průměru 26 mg.kg⁻¹. Další odrůdou kde se podařilo koncentraci stanovit byla odrůda ZVONKOVÉ I.P., kdy obsah vitamínu vykazoval průměrnou hodnotu 47 mg.kg⁻¹. A poslední odrůdou byla FLORINA I.P. s průměrnou hodnotou 19 mg.kg⁻¹. V porovnání s literaturou se nejlépe svým obsahem kyseliny askorbové blíží odrůda ZVONKOVÉ I.P., poněvadž se hodnota shoduje s tabulkami autora Kopce (1998). Velíšek (1999) uvádí hodnotu 15 – 50 mg.kg⁻¹, Rop a kol. (2009) 92 - 124 mg.kg⁻¹. Zbýlé odrůdy měly tedy významně nižší koncentraci kyseliny askorbové než uvádějí literární zdroje. Tato nízká hodnota by mohla být pravděpodobně zapříčiněna ztrátou vitamínu C způsobenou např. odrůdou, způsobem sklizně, skladováním před analýzou, i když byly vzorky homogenizovány a zmrazeny. Tento krok by měl případným ztrátám předcházet. Celkově tedy dle výsledků nelze porovnat obsah vitamínu C u analyzovaných vzorků jablek z ekologických nebo integrovaných produkcí a nelze také určit zda se vnitřní parametry liší v závislosti na odlišné produkci.

Podobný výsledek vyšel i u analýz kyseliny askorbové u stanovovaných odrůd mrkví. Opět to byly odrůdy z ekologického nebo integrovaného zemědělství, kdy byly oproti jablkům testovány pouze, ale v rozličné hustotě rostlin na hektar (600, 900). Stejně tak jako u výsledků jablek, tak i u mrkví nelze ve výsledku tvrdit, že se jakkoliv kvalitativně liší typy mrkví z ekologického pěstování od typů z integrované produkce. A stejně tak nelze porovnat, jestli byla koncentrace vyšší u hustějšího porostu rostlin, či naopak u méně hustého porostu. Jelikož u většiny druhů byla naměřena hodnota nižší než mez stanovitelnosti u použité metody, pouze u odrůdy Aftalon F1 v ekologické kvalitě (ETA 600) byla naměřena koncentrace vitamínu C 149 mg.kg⁻¹ a u odrůdy Cortina F1 v integrované kvalitě (ITC 600) 88 mg.kg⁻¹. Literární zdroje uvádějí obsah vitamínu C v mrkvích Velíšek (1999) 50 – 100 mg.kg⁻¹, Kopec (1998) 49 mg.kg⁻¹, Klein and Perry (2006) 78 mg.kg⁻¹. Odrůda ETA 600 vykazuje vyšší hodnotu než uváděné zdroje a ITC 600 se od zdrojů neliší. Výsledky kyseliny askorbové v jablkách ani mrkvích nelze statisticky ohodnotit, protože většina vykazuje hodnotu nižší než mez stanovitelnosti.

Analýza sacharidů (sacharosa, glukosa, fruktosa) byla provedena u stejných druhů jablek i mrkví, jen za použití jiné HPLC soustavy s odlišným detektorem (RI). Z výsledků analýzy vyplývá, že převažujícím sacharidem v jablkách byla fruktosa, tento fakt se shoduje se studií týmu Soria a kol. (2009). Druhým nejvíce zastoupeným sacharidem byla glukosa a v malé míře byla analyzována přítomnost disacharidu sacharosy. Naměřený obsah koncentrace sacharidů odpovídá hodnotám uvedených v tabulkách Kopce (1998), Suni a kol. (2000) Z porovnávaných vzorků jablek měla nejvyšší obsah sacharidů odrůda ŠAMPION BIO (160 g.kg⁻¹), naopak nejnižší hodnota byla naměřena u jablka druhu TOPAZ BIO (65 g.kg⁻¹). Po srovnání všech sedmi bio a nebio odrůd mezi sebou, nelze u obsahu sacharosy, glukosy a fruktosy statisticky prokázat odlišnost ve způsobu produkce. Potvrzují to výsledky předložené práce, kdy hladiny průkaznosti pro sacharosu $p = 0,2573$, pro glukosu $p = 0,6479$, pro fruktosu $p = 0,0909$ jsou vyšší než hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Toto tvrzení se shoduje s výsledky Prugara (2000), který také nezjistil žádné průkazné rozdíly v obsahu sacharidů mezi bio a nebio systémem.

Obsah sacharidů v mrkvi je nižší než uvádějí literární zdroje Soria a kol. (2009) a Kopec (1998). V celkovém srovnání kvality ekologické versus integrované produkce u mrkve, co se týče obsahu sacharidů, lze jako u jediného ze všech stanovení tvrdit, že všechny bio odrůdy mají vyšší koncentraci sacharidů než ty nebio. Po statistickém zhodnocení je 95% statisticky průkazný rozdíl mezi bio a nebio mrkvemi u sacharosy ($p = 0,0470$) a glukosy ($p = 0,0144$). U fruktosy rozdíl průkazný není ($p = 0,0781$). To není příznivé ohodnocení pro konečný výsledek, protože při srovnání všech typů mrkví je nejvíce zastoupena fruktosa, poté glukosa a v nejnižším počtu sacharosa, což odpovídá stejnému zastoupení jako u analyzovaných jablek. Na vnitřní kvalitě se také podílel fakt, v jaké hustotě rostlin na hektar byly mrkve pěstovány. Po srovnání hodnot nevyšel žádný statisticky průkazný rozdíl, že by rozličná hustota pěstování, měla význam na vyšší obsah sacharidů v mrkvi. V neposlední řadě je také pro výslednou kvalitu velmi důležité, o jakou odrůdu se jedná. Vztaženo na zpracovávané téma předložené práce, vykazuje větší koncentraci sacharidů druh Aftalon F1 u fruktosy na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ ($p = 0,000084$), u glukosy na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ ($p = 0,001416$), u sacharosy nebyl rozdíl v odrůdě statisticky průkazný, ve srovnání s Cortina F1.

Obecně tedy nelze tvrdit a ani zobecnit výsledek, že konvenční potraviny (v tomto případě jablka a mrkve) mají vyšší kvalitativní parametry (obsah sacharidů a vitamínu C) než potraviny integrované. Výsledek vyplývá ze zpracovaného tématu v literární rešerši, kde samý výsledek uvádějí Róth et al. (2007), Bordeleau (2002), a taky následným potvrzení faktu ve výsledcích v experimentální části. Jak už bylo naznačeno výše, kvalita může být ovlivněna i jinými faktory. Jako jsou např. typ pěstované odrůdy, podnebí, typ půdy a následné podmínky skladování. Tyto parametry mají na kvalitu potravin poměrně větší vliv, než jestli byl produkt ošetřován ekologicky či chemickými prostředky (Bordeleau, 2002). Výsledky předložené práce neprokázaly shodu s Rembialkowskou (2003), která stanovila vyšší obsah vitamínu C u ekologických plodin než u integrovaných.

V posledních letech se zvyšuje poptávka po nákupu biopotravin, i když veřejnost nedokáže snadno rozlišit organické výrobky od těch konvenčních a bio produkty jsou často mnohokrát dražší, což je zapříčiněno dražším způsobem pěstování (nejsou použity chemické látky, jejichž použití je levnější) a v neposlední řadě není prokázána větší kvalita biopotravin. Na závěr lze tedy říct, že nákupem biopotraviny si pořizujeme hlavně odlišný způsob produkce dané potraviny.

7. ZÁVĚR

Z literární rešerše vypracované v první části předložené diplomové práce bylo zjištěno, že použití HPLC systému s RI detekcí je vhodnou, rychlou a dobře reprodukovatelnou metodou pro stanovení sacharidů, pro stanovení kyseliny askorbové zase HPLC systém s UV detekcí.

Při validaci metody vykazovaly parametry příznivé hodnoty, proto se metoda může označit za přesnou, s lineární odezvou, spolehlivou a také citlivou. HPLC metoda je tedy postačující pro stanovení kvalitativních parametrů reálných vzorků jablek a mrkví.

Ověřením metody v praxi bylo proměřeno sedm odrůd jablek z ekologické a integrované produkce a dvě odrůdy mrkví, které byly pěstovány v odlišné hustotě a to 600 nebo 900 rostlin na hektar, opět z ekologického zemědělství nebo integrované produkce. Výsledné koncentrace kvalitativních parametrů (kyseliny askorbové, sacharidů) bio a nebio plodin byly porovnávány mezi sebou a následně statisticky vyhodnocovány. Naměřený obsah sacharidů se shoduje s literárními poznatky z rešerše. Obsah kyseliny askorbové byl v porovnání s literaturou nižší.

Dle výsledků experimentální části lze tvrdit, že nebyl nalezen průkazný rozdíl v nutriční kvalitě (vitamin C, sacharosa, glukosa, fruktosa) mezi ekologickými a integrovanými odrůdami analyzovaných jablek a mrkví. U mrkví nebyl statisticky průkazný ani rozdíl mezi rozličnou hustotou pěstování (600/900 rostlin na hektar).

8. SEZNAM LITERATURY

Alexander, R. J. 1998. Sweeteners: Nutritive. Eagan press. Minnesota USA. 116 p. ISBN 0-913250-95-3.

Arya, S. P., Mahajan, M., Jain, P. 2000. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417, 1-14.

Bordeleau, G. 2002. Food quality : a comparison of organic and conventional fruits and vegetables. *Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole*, 81.

Cajka, T., Hajslova, J., Matovska, K. 2008. Mass spectrometry and hyphenated instruments in food analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group. Oxon. 197-228 p. ISBN 978-1-4200-4567-3.

Clarková, N. 2000. Sportovní výživa. Grada Publishing. Praha. 266 s. ISBN: 80-247-9047-5.

Cvet M. 1903. *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci., Biol. Sec.* 14; *Ber. Deut. Botan. Ges.* 24, 316 (1906).

Čáslavský, J. 2010. Pokroky v chromatografii a jejich využití při analýze vod. Sborník konference Pitná voda. České Budějovice. 205-210 s. ISBN 978-80-254-6854-8.

Černý, M., Trnka, T., Buděšínský, M. 2010. Sacharidy. Česká společnost chemická v edici *Chemické listy*. Praha. 184 s. ISBN 978-80-86238-81-4.

Čopíková, J. 1997. *Chemie a analytika sacharidů*. Vydavatelství VŠCHT. Praha. 104 s. ISBN 80-7080-306-1.

Čůta, F., a kolektiv. 1986. *Instrumentální analýza*. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 295 s.

Davídek, J., Hrdlička, J., Karvánek, M., Pokorný, J., Seifert, J., Velišek, J. 1977. Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL nakladatelství technické literatury. Praha. 718 s. ISBN 04-830-77.

Davídek, J., Velišek, J. 1992. Analýza potravin. Ediční středisko VŠCHT. Praha. 122 s. ISBN 80-7080-163-8.

Eliasson, A. CH. 2006. Carbohydrates in food. Second edition, Taylor and Francis Group. New York. 546 p. ISBN 978-0-8247-5942-1.

Fontannaz, P., Kiliñç, T., Heudi, O. 2006. HPLC-UV determination of total vitaminC in a wide range of fortified food products. Food Chemistry, 94, 626-631.

Gratzfeld-Hüsgen A., Schuster R. 1996. HPLC for Food Analysis. Hewlett-Packard Company. Germany. 132 p. ISBN 12-5965-5124E.

Heiger H. 2000. High Performance Capillary Electrophoresis. Agilent Technologies. Germany. 135 p. ISBN 5968-9963E.

Helán, V. a kol. 2005. Analýza organických látek. 2 THETA. Český těšín. 166 s. ISBN 978-80-86380-54-4.

Hoza, I., Kramářová, D. 2006. Potravinářská biochemie II. FT - UTB ve Zlíně. 168 s. ISBN 80-7318-395-1.

Hui, Y. H. 2006. Handbook of food science, technology, and engineering: Taylor & Francis group, LLC. 4 sv. ISBN 0-8493-9847-9.

Chan Mo Cho, Joung Ho Ko, Won Jo Cheong. 2000. Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction. Talanta, 51, 799–806.

- Churáček, J. 1990. Analytická separace látek. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- Jian-Ping Yuan, Feng Chen. 1999. Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC—dual detection. *Food Chemistry*, 64, 423–427.
- Jurková, J., Olšovská, J. 2012. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. *Kvasný průmysl*. 58(2). s. 30-35. ISSN 0023-5830.
- Káš, J., Kodlíček, M., Valentová, O. 2006. Laboratorní techniky biochemie. 1. vydání Vysoká škola chemicko-technologická. Praha. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- Klein, B. P., Perry, A. K. 2006. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States, *Journal of Food Science*, Volume 47, Issue 3, pages 941–945.
- Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. 2. Přepřacované vydání. Pavel Klouda. Ostrava. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- Kopec, K. 1998. Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 72 s. ISBN 80-86153-64-9.
- Kubáň, V., Kubáň, P. 2007. Analýza potravin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 203 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., Holčíková, K. 2006. Vitamin losses, retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of food composition and analysis*, 19, 252-276.
- Luo Jin¹, Xia Min², Ye Neng-sheng¹, Gu Xue-xin¹, Jia Li², Cao Ying-Hua². 2010. Simultaneous HPLC Determination with ELSD of Five Sugars in Foods. *Food Science*, 08.

Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. 2003. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 54, No. 5, Pages 357-371.

Mikeš, O. 1980. *Laboratorní chromatografické metody*. SNTL- nakladatelství technické literatury. Praha. 673 s. ISBN 04-614-80.

Nollet, L.M.L. 1992. *Food analysis by HPLC*. Marcel Dekker INC. New York. 759 p. ISBN 0-8247-8623-8.

Odriozola-Serrano, I., Hernández-Jover, T., Martín-Belloso, O. 2007. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*, 105, 1151–1158.

Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z. 2002. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Karolinum. Praha. 203 s. ISBN 80-246-0553-8.

Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová, J., Kohout, P. 2002. *Základy výživy*. Svoboda servis. Praha. 207 s. ISBN: 80-86320-23-5.

Prugar, J. 2000. *Kvalita rostlinných produktů ekologického zemědělství. Ústav zemědělských a potravinářských informací*. Praha. 80 s. ISBN 80-7271-048-6.

Rahman, N. A., Hasan, M., Hussain, M. A., Jahim, J. 2008. Isomerization Process by High performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Modern Applied Science*, 2 (4).

Rembialkowska, E. 2003. Organic farming as a system to provide better vegetable quality. *Acta Hort. (ISHS)* 604:473-479.

Rogatsky, E., Jayatilake, H., Goswami, G., Tomuta, V., Stein, D. Sensitive LC MS quantitative analysis of carbohydrates by Cs²⁺ attachment. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 1805–1811.

Rop, O., Kramářová, D., Juríková, T., Janík, M., Hoza, I., Mlček, J., Valášek, P. 2009. Chemical characteristics of fruit in selected local apple varieties, *Acta fytotechnica et zootechnica*, 573-579.

Róth, E., Berna, A., Beullens, K., Yarramraju, S., Lammertyn, J., Schenk, A., Nicolai, B. 2007. Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45 (1), 11–19.

Sesta, G. 2006. Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37. 84 – 90.

Soria, A. C., Sanzb, M. L., Villamiela, M. 2009. Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC–MS. *Food Chemistry*, 114 (2), 758–762.

Sullivan, K. 1999. *Healthy eating*. Trafalgar square. London. 192 p. ISBN: 13 978-0004723228.

Suni, M., Nyman, M., Eriksson, N. A., Björk, L., Björck, I. 2000. Carbohydrate composition and content of organic acids in fresh and stored apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (10), 1538–1544.

Svačina, Š., Bretšnajdrová, A. 2008. *Jak na obezitu a její komplikace*. Grada Publishing. Praha. 144 s. ISBN: 978-80-247-2395-2.

Štulík, K. 2004. *Analytické separační metody*. Karolinum. Praha. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

Tatarkovičová, V. 24. 9. 2012. pers. comm.

Velišek, J. 1999. *Chemie potravin 2*, 1. vydání OSSIS nakladatelství. Tábor. 304 s. ISBN 80-902391-4-5.

Velíšek, D. 2002. Chemie potravin 3. OSSIS nakladatelství. Tábor. 243 s. ISBN 80-86659-03-8.

Velíšek, J., Cejpek, K. 2008. Biosynthesis of Food Components. OSSIS nakladatelství. Tábor. 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.

Vodrážka, Z. 1996. Biochemie. Academia. Praha. 191 s. ISBN: 80-200-0600-1.

Weibel, F.P., Bickel, R., Leuthold, S., Alföldi, T. 2000. Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. Acta Hort. (ISHS) 517:417-426.

Weston, A. 1997. HPLC and CE, Principles and Practice. Sunnyvale: Saunders Company. 280 p. ISBN: 0-12-136640-5.

Wilson, A. M., Work, T. M., Bushway, A. A., Bushaway, R. J. 1981. HPLC Determination of Fructose, Glucose, and Sucrose in Potatoes. Journal of Food Science, 46. 300 – 301.

Internetové zdroje:

Advanced Materials Technology. 2013. Stationary Phase Support [online]. Wilmington [cit. 2013-14-3]. Dostupné z <<http://www.advanced-materials-tech.com/products.html>>

Coufal, P. 2004. High Performance Liquid Chromatography HPLC, Separální metody [online]. Praha [cit. 2012-24-9]. Dostupné z <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC/hplc.html>

Cvačka, J. 2011. Trendy v moderní HPLC [online]. Praha [cit. 2012-26-9]. Dostupné z <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf>>

Cvačka, J. 2010. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [online]. Praha. [cit. 2012-21-8] Dostupné z <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>>

Davídková, R. 2007. Sacharidy [online]. Brno. [cit. 2012-21-12] Dostupné z <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/dp/davidova/www_ucitele1/sacharidy.html>

Douša, M. 1999-2008. HPLC, High Performance Liquid Chromatography [online]. Brno [cit. 2012-21-8]. Dostupné z <<http://www.hplc.cz/>>.

Douša, M. 2009. UPLC [online]. Brno [cit. 2013-13-3]. Dostupné z <<http://www.hplc.cz/>>.

Háková, E. 2012. Pokroky v moderních separačních metodách [online]. Praha [cit. 2013-13-3]. Dostupné z <http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc?student_welcome=1>.

Chromservis, 2012. Technologie s pevným jádrem a porézním povrchem [online]. Praha [cit. 2012-26-9]. Dostupné z <<http://chromservis.cz/item/core-shell-technology?lang=CZ>>

Klimesová, I. 2006. Katedra funkční antropologie a fyziologie [online]. Olomouc. Fakulta tělesné výchovy [cit. 2012-12-12]. Dostupné z <<http://www.upol.cz/fakulty/ftk/struktura/katedry-a-pracoviste/katedra-funkciantropologie-a-fyziologie/vyuka/mgr-i-klimesova-phd/>>

Kodíček, M. 2012. Biochemické pojmy, výkladový slovník [online]. Praha. Vysoká škola chemicko-technologická [cit. 2012-18-12]. Dostupné z <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/>

Labicom. 2012. Silikagel Nucleosil, sorbent Nucleoshell [online]. Olomouc [cit. 2012-24-10]. Dostupné z <<http://www.labicom.cz/macherey-nagel-207/>>

Microsolv Technologies. 2012. About TYPE-C Silica™ based HPLC products [online]. Eatontown [cit. 2012-24-9]. Dostupné z <http://www.microsolvtech.com/hplc/typec_about3.asp>

Náprstek, R. 2012. E300 - Kyselina L-askorbová (Vitamin C) [online]. Hlinsko [cit. 2012-7-11]. Dostupné z <<http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E300>>

Navrátilová, L. 2009. Chemická struktura vitamínu C [online]. Brno [cit. 2012-15-11]. Dostupné z <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/dp/davidova/www_ucitele1/vitaminy.html>

Sichová, L., Jančář, L. 2005. Výukový systém vitamín C, Titrační metody [online]. Brno [cit. 2012-7-11]. Dostupné z <<http://www.ped.muni.cz/wchem/comenius2000/vitaminC/index.htm>>

Störmann, R. 2003. Scheme of a HPLC System [online]. Germany, Bremen [cit. 2012-20-9]. Dostupné z <<http://www.uft.uni-bremen.de/chemie/Chromatography/chrom065.htm>>

Šebela, M. 2012. Chromatografické metody v biochemii [online]. Univerzita Palackého v Olomouci, katedra biochemie [cit. 2012-24-9]. Dostupné z <<http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/bam/07.ppt>>

Štefánek, J. 2011. Nedostatek vitamínu C [online]. 1. LF Univerzita Karlova v Praze. [cit. 2012-7-11]. Dostupné z <<http://www.stefajir.cz/?q=nedostatek-vitamínu-c>>

Vávrová, J. 2012. Stacionární fáze v kapalinové chromatografii [online]. NSPKA, Karviná [cit. 2012-26-9]. Dostupné z <http://www.nspka.cz/NSPKA_prirucky/2012/laboratorni_prirucka_OKBH_orlova/JVAFB.htm>

Vyhláška 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin. Ze dne 1.8. 2004. Dostupné z <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005990&docType=ART&nid=11307>>

Žáková, P., Roušar, T., Kandřák, R., Ventura, K. 2003. Stanovení vitamínu C pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí [online]. Chemicko-technologická fakulta, Pardubice [cit. 2012-28-11]. Dostupné z <www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_09C.doc>