



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VALIDACE METODY HPLC PRO STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN V NÁPOJÍCH

VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN BEVERAGES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. SILVIE HANYCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2018

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá validací RP–HPLC metody pro stanovení organických kyselin v ovocných šťávách. Cílem práce bylo zjištění vhodnosti metody pro ověření autenticity ovocných šťáv na základě analýzy organických kyselin. Teoretická část se zabývá chemickým složením ovoce a ovocných šťáv s důrazem na organické kyseliny. Dále jsou popsány metody analýzy organických kyselin. Detailněji je popsána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie a postupy při její validaci. Experimentální část práce je zaměřena na optimalizaci a validaci metody. Analyzovány byly kyselina jablečná, citronová, jantarová a askorbová. Byly ověřeny validační parametry: opakovatelnost, linearita, mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Validovanou RP–HPLC metodou byly analyzovány reálné vzorky 100% ovocných šťáv (jablečná, pomerančová a grapefruitová), u kterých byly ověřeny vybrané parametry autenticity.

Abstract

This diploma thesis focuses on validation of RP–HPLC method for determination of organic acids in fruit juices. The aim of this thesis was to determine suitability of the method for verification of the fruit juices authenticity based on analysis of organic acids. The theoretical part describes chemical composition of fruit and fruit juices and focuses on organic acids. It provides description of various methods of organic acids analysis with more detailed description of High Performance Liquid Chromatography and its validation. The experimental part focuses on optimization and validation of the method. Samples of malic, citric, succinic and ascorbic acid were analysed. The optimized method was validated and following performance parameters were determined: repeatability, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ). RP–HPLC method was applied to real samples of 100% fruit juices (apple, orange and grapefruit) and the authenticity parameters were verified.

Klíčová slova

ovocné šťávy, autenticita, organické kyseliny, HPLC, validace metody

Keywords

fruit juices, authenticity, organic acids, HPLC, method validation

HANYCHOVÁ, S. *Validace metody HPLC pro stanovení organických kyselin v nápojích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 68 s. Vedoucí doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Bc. Silvie Hanychová

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady.

Bc. Silvie Hanychová

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Chemické složení ovoce a ovocných šťáv	8
2.1.1	Hlavní složky ovoce a ovocných šťáv	8
2.1.2	Organické kyseliny	11
2.2	Autenticita ovocných šťáv	14
2.2.1	Význam analýzy organických kyselin v ověřování autenticity ovocných šťáv	15
2.2.2	Způsoby falšování ovocných šťáv	15
2.3	Metody stanovení organických kyselin	17
2.3.1	Celková kyselost	17
2.3.2	Elektromigrační metody	17
2.3.3	Chromatografické metody	18
2.3.4	Enzymatické metody	18
2.4	Analýza organických kyselin pomocí HPLC	19
2.4.1	Kapalinový chromatograf	19
2.4.2	Mobilní fáze	20
2.4.3	Stacionární fáze	22
2.4.4	Detekční systémy	24
2.5	Validace metody HPLC	27
2.5.1	Správnost metody (accuracy)	28
2.5.2	Přesnost metody (precision)	29
2.5.3	Linearita a rozsah metody	30
2.5.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti	30
2.5.5	Selektivita metody	30
2.5.6	Robustnost metody	31
3	Experimentální část	32
3.1	Přístroje	32
3.2	Pomůcky	32
3.3	Chemikálie	33
3.4	Popis analyzovaných vzorků	34
3.5	Pracovní postupy	35
3.6	Validované parametry analytické metody	36
3.6.1	Opakovatelnost metody	36
3.6.2	Linearita metody	36
3.6.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	36
3.7	Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy	37
3.7.1	Statistické zpracování naměřených dat	37

4	Výsledky a diskuze	39
4.1	Optimalizace podmínek HPLC metody	39
4.1.1	Výběr kolony	39
4.1.2	Složení mobilní fáze	40
4.1.3	Volba elučního módu	40
4.1.4	Průtok mobilní fáze	40
4.1.5	Teplota kolony	42
4.1.6	Objem nástřiku vzorku	42
4.2	Validace HPLC metody	42
4.2.1	Opakovatelnost metody	43
4.2.2	Linearita metody	44
4.2.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	47
4.3	Analýza reálných vzorků	52
4.3.1	Jablečná šťáva	52
4.3.2	Pomerančová šťáva	53
4.3.3	Grapefruitová šťáva	55
5	Závěr	57
	Seznam symbolů a zkratk	58
	Seznam obrázků	60
	Seznam tabulek	61
	Seznam grafů	62
	Přílohy	63
	Literatura	64

1 Úvod

Ovocné šťávy konzumují lidé od pradávna. Jsou výborným zdrojem jednoduchých přírodních cukrů, polysacharidů, vitaminů a minerálních látek. Obsahují významné množství kyselin, které dodávají šťávě vyváženou chuť. Dále obsahují barviva a aromatické látky, díky kterým jsou sensoricky zajímavé.

Lze rozlišit šťávy přímo lisované nebo šťávy vyrobené z koncentrátu. Koncentrace bývá doprovázena jímáním aroma. Proces rekonstituce, tedy výroby ovocné šťávy z koncentrátu přidáním vody a odebraného aroma, skýtá příležitost k falšování výrobku. Hlavním problémem v autenticitě ovocných šťáv bývá snížení ovocného podílu. Toho je možné dosáhnout větším přídavkem vody a případným doslazením a dokyselením výrobku. Levnější druhy ovoce mohou být mícháány s dražšími, nebo může být ve výrobku nedeklarovaný přídavek dužniny. Dochází také k falšování v podobě neúplného navrácení aroma při rekonstituci. Tyto jevy mohou více či méně doprovázet také výrobu přímo lisovaných šťáv.

Kontrolní orgány jsou vzhledem ke vzrůstající sofistikovanosti falšování nuceny vyvíjet přesnější metody pro jeho odhalení. Dříve se ke zjištění falšování používala sensorická analýza, dnes již není dostačující pro její nízký práh detekce a nízké rozlišení. Pomocí instrumentálních metod lze detekovat látky přesněji a s nižšími mezemi detekce. Kapalinovou chromatografií lze detekovat přídavek konkrétních cukerných složek či obsah kyselin; plynová chromatografie poslouží k rozpoznání a kvantifikaci aromatických látek; izotopová analýza rozpozná původ ovoce. Mnohé další metody lze použít k ověření autenticity ovocných šťáv.

Práce se věnuje analýze organických kyselin v souvislosti s ověřováním autenticity ovocných šťáv. Analýza organických kyselin poskytuje cenné informace. Lze například detekovat přídavek syntetické kyseliny nebo určit, zda se jednotlivé kyseliny pohybují v normovaném rozmezí. Pomocí těchto informací lze zhodnotit podezřelost výrobku z porušení jeho autenticity a kombinací s dalšími metodami lze takové podezření potvrdit či vyvrátit. Organické kyseliny lze analyzovat pomocí metod enzymatických, chromatografických, elektromigračních či titračním stanovením celkových kyselin. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla pro práci vybrána pro její rychlou aplikaci a přesné výsledky. Systém s reverzními fázemi nabízí možnost použití vodných mobilních fází.

Cílem práce je zjištění vhodnosti metody pro ověření těch parametrů autenticity ovocných 100% šťáv, které lze odhalit analýzou organických kyselin. Hlavní náplní práce je validace metody – ověření opakovatelnosti, linearity v potřebném koncentračním rozsahu a zjištění detekčních a kvantifikačních mezí.

2 Teoretická část

2.1 Chemické složení ovoce a ovocných šťáv

Obsah látek v ovoci může být ovlivněn odrůdou, zralostí a dalšími faktory. Hlavními složkami jsou cukry, polysacharidy a organické kyseliny, zatímco dusíkaté sloučeniny a lipidy jsou přítomny v menším zastoupení. Minoritními složkami jsou barviva a aromatické látky, obojí důležité pro sensorickou kvalitu, zatímco vitamíny a minerály se více účastní na kvalitě nutriční [1].

V následujících kapitolách jsou popsány některé složky ovoce, konkrétně jablek, pomerančů a grapefruitů, neboť šťávy z nich vyrobené jsou hlavním cílem pro analýzu metodou, kterou se tato práce zabývá. V *tabulce 2.1* jsou uvedeny vybrané základní složky ovoce.

Tabulka 2.1: Složení vybraného ovoce. Titrační kyselost počítána jako kyselina jablečná (M), citronová (C) [2].

	Jablko	Pomeranč	Grapefruit
Sušina	16,0	13,0	11,4
Celkové cukry	11,1	7,0	6,7
Titrační kyselost	0,6 (M)	0,8 (C)	1,3 (M)
Vláknina	2,1	n.d.	n.d.
Pektin	0,6	n.d.	n.d.
Popel	0,3	0,4	0,5
pH	3,3	3,3	3,3

2.1.1 Hlavní složky ovoce a ovocných šťáv

Voda

Obsah vody v ovoci je asi 85–90 % celkové hmotnosti plodů. Je významnou složkou jak sensorickou, tak technologickou [1].

Sacharidy

Z monosacharidů je v ovoci nejvyšší obsah glukózy a fruktózy. Malé množství heptulóz se nachází v dužnině jablek a ve slupkách pomerančů a grapefruitů. Dominantním disacharidem je sacharóza. Ostatní cukry jsou přítomny ve stopovém množství. V jablečné šťávě je přítomen například derivát D-sorbitol, ve šťávách z citrusů meso-inositol [1].

Z polysacharidů jsou v ovoci významné celulóza, hemicelulóza, pentosany a pektiny. Stavebními jednotkami těchto polysacharidů jsou glukóza, galaktóza, manóza, arabinóza, xylóza, rhamnóza, fruktóza a galakturonová a glukoronová kyselina. Celulóza a hemicelulóza tvoří dužninu ovoce a v ovocných šťávách jsou původci zákalů a kalů. Spolu s dalšími

látkami se polysacharidy podílejí na pevnosti plodu, která je jedním z kritérií pro technologické zpracování ovoce. Obsah polysacharidů v průběhu zrání postupně klesá a zvyšuje se obsah monosacharidů a disacharidů [1].

Kyseliny

Kyseliny mají výrazný vliv na chuť a flavour ovoce. Jejich obsah má velký vliv na údržnost ovoce a odolnost proti napadení škůdci. Kyseliny jsou bakteriostatickými činiteli a ovlivňují řadu chemických reakcí. V ovoci jsou hlavními nositeli kyselé chuti. Kyselost ovoce je jedním z důležitých faktorů pro hodnocení zralosti ovoce a má také vliv na přijatelnost ovoce konzumentem. Obecně platí, že nezralé ovoce je velmi kyselé díky vysokému obsahu organických kyselin. Hodnota pH nezralého ovoce je často pod hodnotou 3 a zvyšuje se v průběhu zrání díky konverzi organických kyselin na cukry [3].

Organické kyseliny se účastní mnoha biochemických drah a jejich metabolismus je úzce spojen s metabolismem cukrů, neboť obě dvě skupiny látek mohou sloužit jako respirační substrát při zrání ovoce. Organické kyseliny se při zrání ovoce akumulují podobně jako cukry ve vakuole buněk do vysokých koncentrací, čímž přispívají k udržení hydrostatického tlaku potřebného k růstu buněk a ovoce [4].

Organické kyseliny jsou v ovoci hlavními vazebnými partnery kovů. S kovovými ionty tvoří soli a jejich anionty mají vlastnosti ligandů, s kovy tvoří také směsné komplexy (vazba chromu v oxaláto-malátovém komplexu, vazba Ni a Zn v citráto-malátovém komplexu). Organické kyseliny se podílejí na stabilizaci rostlinných barviv, například kyselina jablečná a citronová běžně tvoří s anthokyany interakce typu ion-ion. Svůj význam sehrávají organické kyseliny také v ověřování pravosti ovocných výrobků [5], [6].

Detailněji jsou organické kyseliny popsány v kapitole 2.1.2.

Barviva

Degradaci chlorofylu při zrání ovoce dochází k odkrytí barviv, která již v ovoci byla přítomna. Dochází ale také k syntéze nových pigmentů, flavonoidních nebo karotenoidních. Tyto dva jevy přispívají v různé míře k barevným změnám ovoce [7].

Hlavními barvivy v citrusových plodech jsou karotenoidy, jejichž chemická struktura má vliv na barvu plodů. Syntéza karotenoidů v metabolismu vychází z obecné isoprenoidní dráhy, nejvýznamnějšími produkty jsou β -karoten a jeho prekurzor lykopen. Jejich obsah se může výrazně lišit podle odrůdy daného citrusu. Ve slupkách převládá kryptoxanthin, lutein, směs isomerů violaxanthinu, antheraxanthin a zeinoxanthin. Některé karotenoidy bývají používány jako barviva do pomerančových šťáv, jsou proto významnými součástmi technologie zpracování pomerančů. Dobrým zdrojem karotenoidních barviv jsou slupky citrusů. Na zbarvení pomerančů a grapefruitů se podílí také anthokyany, v plodech jich lze nalézt až 30 druhů [3], [7].

Jablka i citrusové plody jsou zdrojem přírodních pigmentů rozsáhlé skupiny flavonoidů. Nejvýznamnějšími z nich jsou anthokyany, flavanony a flavonoly. Výrazně vyšší obsah těchto látek je ve slupce než v dužnině. Barviva jsou lokalizována v buněčných vakuolách a stabilizována interakcemi ion-ion s organickými kyselinami, např. malonovou, jablečnou, citronovou. Celkový obsah polyfenolických látek je ve slupce $1\,604\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, v dužnině $481\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. V čerstvé jablečné šťávě je $63,8\text{--}163,4\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [3], [6].

Vitaminy

Jablka, pomeranče i grapefruity jsou výbornými zdroji vitaminů. Vitamin C se vyskytuje významnou měrou v čerstvém ovoci, ztráty nastávají při zpracování. V jablkách je 15–50 mg/kg, citrusové plody jsou zdrojem významnějším (pomeranč 300–600 mg·kg⁻¹, grapefruit 240–700 mg·kg⁻¹). Provitamin A (nejvýznamnějším provitaminem A je beta-karoten) je ve výrazném množství přítomen v jablkách (0,1–0,3 mg·kg⁻¹) a pomerančích (0,5–4,0 mg·kg⁻¹). Významný obsah riboflavinu nalezneme v citrusech (grapefruit 20–100 mg/100g, pomeranč 150–900 mg·kg⁻¹). Významným zdrojem thiaminu jsou citrusové plody (0,4–1,0 mg·kg⁻¹), méně je ho v jablkách (0,2–0,4 mg·kg⁻¹). Niacin je v citrusovém ovoci v koncentracích 1,0–4,0 mg·kg⁻¹ a v jablkách 1,0 mg·kg⁻¹. V menších množstvích jsou v pomerančích, grapefruitech i jablkách přítomny také pyridoxin, biotin, kyselina listová a kyselina pantothenová [2], [5].

Minerální látky

Minerální látky jsou v ovoci obsaženy ve formě anorganických nebo organických solí. Nejvyšší zastoupení má obvykle draslík, dále také vápník, hořčík, fosfor a v nižších množstvích bývá v ovoci obsaženo železo, sodík, zinek, měď a mangan. Jablka i citrusové plody mají podobná množství sodíku a síry, liší se v obsahu dalších prvků. Významnějším zdrojem draslíku, hořčíku, vápníku a fosforu jsou citrusy, zatímco chloru je více v jablkách. Některé minerály nejsou plně nutričně dostupné, například železo nevázané v hemové struktuře, nebo vápník vázaný na oxalát. Minerály jsou důležitou složkou, díky které konzumace ovoce přispívá k vyvážené stravě [3], [5].

Aromatické a chuťové látky

Vývoj aromatických látek je nejvýraznější v konečných fázích zrání ovoce. Vliv na aroma ovoce má také prostředí růstu a posléze podmínky skladování. Pro jednotlivé odrůdy ovoce jsou charakteristické konkrétní aromatické látky. Na biosyntéze aromatických těkavých látek se podílí ethylen, některé aminokyseliny, mastné kyseliny, prekurzory a enzymy alkoholacyltransferáza, alkoholdehydrogenáza a lipoxygenáza. Celkový flavour ovoce je způsoben látkami alkoholickými, aldehydy, ketony, estery a kyselinami [3].

Typický jablečný flavour tvoří ethylpropionát, hexylacetát, methylacetát, ethylhexanoát, butanol, propanol a další [8], [9].

Typická hořká chuť citrusového ovoce a šťáv je způsobena přítomností flavanon-7-glykosidů. Hořká látka grapefruitů se nazývá naringin, v citrusových plodech jsou dále intenzivně hořké triterpenoidy limonin, nomilin, ichangin a nomilinová kyselina [5].

Aroma pomerančů a pomerančových šťáv tvoří hlavně D-limonen a další látky jako ethylbutanoát, beta-myrcen, oktanal, dekanal a linalool. Dále jsou přítomny látky hex-3-enal, jehož vůně byla popsána jako travnatá, příjemně vonící laktony nebo estery s ovocnou vůní ethyl-2-methylpropanoát, ethylbutanoát a ethyl 2-methylbutanoát [10], [11].

Aroma grapefruitů je tvořeno estery s ovocnou vůní ethyl 2-methylpropanoátem, ethylbutanoátem, a ethyl-2-methylbutanoátem, přítomny jsou také laktony a látky vonící po trávě, stejně jako v pomerančích. Trans-4,5-epoxydec-2-enal je původcem kovového pachu grapefruitů. Typické grapefruitové aroma je tvořeno dále látkami 4-merkpto-4-methylpentan-2-onem a 1-p-menthen-8-thiolem [10].

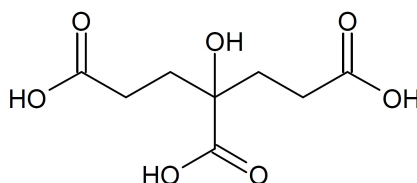
2.1.2 Organické kyseliny

Významnou složkou ovoce jsou kyseliny, například kyselina citronová v citrusových plodech nebo kyselina jablečná v jablkách. Dalšími jsou kyselina octová, vinná, jantarová a fumarová. Některé vlastnosti těchto kyselin jsou uvedeny v *tabulce 2.2*.

Tabulka 2.2: Vlastnosti vybraných organických kyselin [12], [13].

	Sumární vzorec	Označení aditiva	pKa	Chuť
citronová	$C_6H_8O_7$	E330	3,128	kyselá
octová	$C_2H_4O_2$	E260	4,756	kyselá, štiplavá
mléčná	$C_3H_6O_3$	E270	3,862	jemně kyselá
jablečná	$C_4H_6O_5$	E296	3,458	ostře kyselá
jantarová	$C_4H_6O_4$	E363	4,207	hořko-slaná
vinná	$C_4H_6O_6$	E334	3,036	kyselá

Kyselina citronová



Vzorec kyseliny citronové

Kyselina citronová (hydroxytrikarboxylová) je nejvýznamnějším zástupcem skupiny trikarboxylových hydroxykyselin. Nachází se v citronech, brusinkách, rybízu, ostružinách a dalším ovoci. V citrusových plodech bývá až 8 % kyseliny citronové. V řepě cukrové se nachází ve formě solí jako citran vápenatý. Citran sodný, draselný a vápenatý se nachází v mléku. Poprvé byla kyselina citronová izolovaná v krystalické podobě z citronové šťávy Scheelem roku 1784 a citrony byly dlouho jediným zdrojem pro její výrobu. Výroba spočívala ve zkvašení citronové šťávy a neutralizaci zralého kvasu roztokem hydroxidu vápenatého. Následně se izoloval vzniklý citran vápenatý a kyselinou sírovou se z něj uvolnila kyselina citronová (tzv. izolační výroba) [14].

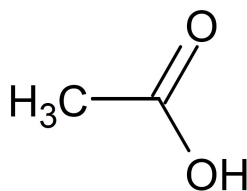
Dnes se kyselina citronová vyrábí kvašením. Pro povrchové i submerzní kvašení se používá *Aspergillus niger*, ale dají se použít i jiné druhy plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Kyselina citronová je jedním z hlavních produktů aerobní oxidace v metabolických drahách a je produkována intracelulárně. Jako růstové médium se často používá melasa. Od roku 1923 je úspěšně produkována pomocí moderní biotechnologie a roční produkce je přibližně 1,6 mil. tun, přičemž asi polovina je vyráběna v Číně (tzv. mikrobiální výroba) [14], [15].

Téměř polovina vyrobené kyseliny citronové se používá do nápojů a potravin. Dále do mýdel, detergentů a dalších chemických výrob. Používána je ke snižování pH, čímž lze dosáhnout slabého antimikrobiálního účinku, a zároveň kyselé chuti například v nápojích. V konzervovaném ovoci a zelenině se používá přídavků kyseliny citronové ke zvýraznění

chuti. Dále se přidává jako chelatační činidlo pro inhibici vzniku dimethylaminu v rybách nebo jako antioxidant [14], [15].

Kyselina citronová je významnou složkou citrusových plodů. Během zrání plodů klesá její množství až o 55 %, zatímco množství ostatních kyselin klesá méně významně nebo neklesá vůbec. Zkoumáním genových expresí a metabolismů bylo zjištěno, že kyselina citronová je během zrání uvolněna z vakuoly do cytosolu a postupně metabolizována na isocitrát, 2-oxoglutarát a glutamát [3].

Kyselina octová



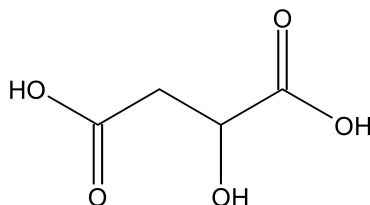
Vzorec kyseliny octové

Kyselina octová (ethanová) se přirozeně vyskytuje v ovoci, sýru, odstředěném mléku, kakau nebo kávě. Ocet je 4–8 % roztok kyseliny octové ve vodě [16].

Kyselina octová se vyrábí již od středověku a je historicky nejstarší okyselující látkou. Výroba kyseliny octové je tradiční biotechnologickou praxí. Dvoukrokovou fermentační technologií se za pomoci kvasinek oxidují cukry na ethanol a pomocí bakterií rodu *Ace-*tobacter se ethanol oxiduje na kyselinu octovou. Tradiční výroba octa se prováděla na bukových hoblinách, které sloužily k imobilizaci mikroorganismů a umožňovaly snadné provzdušňování. V současnosti je nejrozšířenější metodou výroby kyseliny octové tzv. "metoda rychlého octářství", kde jsou bukové hobliny nahrazeny umělým sorbentem a ocetnice jsou velké až 800 hl [14], [15].

Využití nalézá kyselina octová ve výrobcích jako je nakládaná zelenina a houby, salátové zálivky, majonézy, omáčky, kečupy a pekařské výrobky. Používá se jako okyselovací a dochucovací prostředek, ale také k úpravě pH jako konzervant zabráňující růstu mikroorganismů. V potravinách je kyselina octová bezpečnou složkou, ale ve vyšších koncentracích může vyvolat nežádoucí účinky, například poškození kůže či sliznic [16], [17].

Kyselina jablečná



Vzorec kyseliny jablečné

Kyselina jablečná (hydroxybutandiová) je bezbarvá krystalická látka silně kyselé chuti. Kyselina L-jablečná se přirozeně vyskytuje v přírodě, nejvíce v nezralém ovoci, zelených

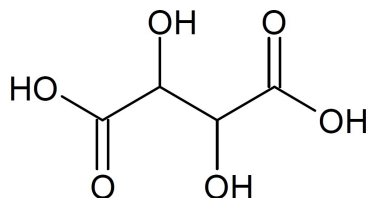
jablkách, višních, hroznech apod. Kyselina D-jablečná naopak přirozený výskyt v ovoci nemá. [16].

Používá se jako aditivum pro ovlivnění flavouru potravin a při zrání vína. Dále nachází využití jako aditivum do mražených pekárenských produktů, nápojů, želatin a dalších výrobků. Bylo stanoveno, že kyselina jablečná je bezpečná látka bez nežádoucích účinků, je proto povoleno ji přidávat do potravin v množství potřebném k potravinářské výrobě [16], [18].

Kyselinu jablečnou je možné vyrobit biotechnologicky z kyseliny fumarové pomocí imobilizovaného enzymu fumarasy [15].

Kyselina jablečná je nejvýznamnější organickou kyselinou jablek. Její obsah se během zrání může snížit až o 50 %, a to díky nárůstu respirační křivky ovoce. Je syntetizována ze sacharidů glykolýzou a pentózofosfátovým cyklem za přítomnosti enzymů fosfoenolpyruvát karboxylázy a malát dehydrogenázy. Degradace kyseliny jablečné je výrazně snížena za pomoci inhibitorů biosyntézy ethylenu [3].

Kyselina vinná

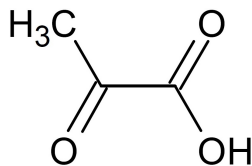


Vzorec kyseliny vinné

Kyselina vinná (2,3-dihydroxybutandiová) je bezbarvá krystalická látka silně kyselé chuti bez zápachu, přirozeně se vyskytující v ovoci, především v hroznovém víně. Jako vedlejší produkt z hroznů bývá obvykle izolována při výrobě vína [16].

Používá se jako přídatek upravující pH a chuť do vína, pekárenských práškových směsí, mražených mléčných výrobků, želé, pečiva, sušených vaječných bílků, nápojů, potravinářských barviv a cukrovinek. Hydrogenvinan draselný bývá součástí kypřících prášků. Kyselina vinná se používá také jako emulgační a chelatační činidlo, vyvazuje především ionty mědi, železa a niklu, čímž zvyšuje stabilitu potravin a nápojů. Látka je považována za bezpečnou, v EU je použití kyseliny vinné povoleno v nezbytném množství, s výjimkou dětské výživy [16], [17], [18].

Kyselina mléčná

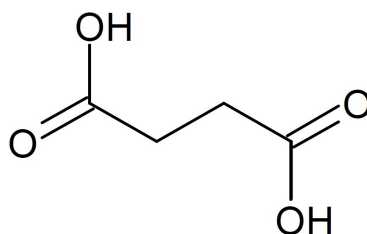


Vzorec kyseliny mléčné

Kyselina mléčná (2-hydroxypropanová) je bezbarvá tekutina bez zápachu, obvykle sirupovité konzistence. Je přirozeným meziproductem savčího metabolismu glukózy a glykogenu, nachází se v krvi a ve svalech (vzniká ze svalového glykogenu při tělesné námaze a do krve se následně vyplavuje ve formě solí – laktátů). Je také produktem kvasného procesu především mléčného kvašení, přirozeně se vyskytuje v kvašených potravinách, například v kysaném mléce, pivu, kysaném zelí, kvašených okurkách či jiných potravinách připravených za pomoci bakteriálního kvašení. Komerčně je kyselina mléčná vyráběna fermentací syrovátky, kukuřičného škrobu, brambor nebo melasy, nebo synteticky [16], [18].

Používá se jako okyselovadlo a látka zvýrazňující chuť nápojů, cukrovinek, oliv, sýrových výrobků, mražených dezertů, želé, džemů a dalších potravin. Dále zesiluje účinnost antioxidantů, čímž opět ovlivňuje stabilitu potravin. Kyselina L-mléčná se používá do dětských výživ. Nežádoucí reakce mohou být u malých dětí způsobeny D-formou. Jiné nežádoucí účinky nejsou známy, proto je považována za látku bezpečnou pro použití v potravinářství [17], [18].

Kyselina jantarová



Vzorec kyseliny jantarové

Kyselina jantarová (butandiová) je krystalická látka bílé barvy, kyselé chuti, bez zápachu. Přirozeně se vyskytuje v řepě, rebarboře, masu, sýrech, melase, vejcích a ovoci. Kyselina jantarová se průmyslově vyrábí z kyseliny octové nebo fermentačně z kukuřice či jiných sacharidických zdrojů [16], [17].

Používá se jako látka upravující kyselost potravin a nápojů a zvýrazňující chuť, například do vín a likérů. Kyselina jantarová je také využívána jako látka zpomalující zrání rostlin. Je považována za látku bezpečnou pro potravinářské použití [16], [17], [18].

2.2 Autenticita ovocných šťáv

Falšování je nevyhnutelným jevem, který postihuje téměř všechny obory už od nepaměti, potravinářský průmysl nevyjímaje. Falšování potravin může zahrnovat změněné složení nebo jiný obsah některé ze složek potraviny, uvedení jiné odrůdy nebo druhu, nesprávně uvedený geografický původ nebo stáří potraviny, jiný způsob výroby a technologie než je deklarovaný [20].

Nejčastější porušování autenticity je u ovocných výrobků sledováno právě u ovocných 100 % šťáv. Doslazování, ředění 100 % ovocných šťáv nebo přidavek jiných látek bez uvedení této skutečnosti na obalu je z legislativního hlediska v rozporu s vyhláškou ministerstva zemědělství č. 335/1997 Sb., taková praktika může být kvalifikována jako klamání spotřebitele. Vyhláška udává také požadavky na označení, jakost i technologie [19], [20], [21].

Další legislativou ošetřující složení a kvalitu potravin a omezující falšování je Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. a nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 178/2002.

2.2.1 Význam analýzy organických kyselin v ověřování autenticity ovocných šťáv

Jednou z možností ověření pravosti ovocných šťáv je analýza organických kyselin. Ty se v jednotlivých druzích ovoce vyskytují v charakteristických množstvích a poměrech, které mohou být falšováním narušeny. Stanovení organických kyselin je proto jednou z analýz, které mohou napomoci k odhalení falšovaného výrobku, nebo ho v kombinaci s dalšími stanoveními označit za falšovaný.

Obsahy jednotlivých organických kyselin jsou spolu s dalšími parametry uvedeny v ISO normách, které uvádějí požadavky na jakost, identitu a autenticitu ovocných šťáv. Vybrané části těchto tří norem týkající se organických kyselin jsou uvedeny v *tabulkách 5.1, 5.2 a 5.3*.

- ČSN 56 8543 Ovocné a zeleninové šťávy – Jablečná šťáva = Fruit and vegetable juices – Apple Juice
- ČSN 56 8542 Ovocné a zeleninové šťávy – Grapefruitová šťáva = Fruit and vegetable juices – Grapefruit Juice
- ČSN 56 8541 Ovocné a zeleninové šťávy – Pomerančová šťáva = Fruit and vegetable juices – Orange Juice

Tyto normy slouží jako vodítko při kontrole výrobků, nejsou však legislativně závazné. Závaznost je v tomto případě vůči výše uvedeným zákonům a nařízením, jejichž porušení lze detekovat sledováním parametrů v normě uvedených.

2.2.2 Způsoby falšování ovocných šťáv

Nejčastějšími nedostatky ovocných šťáv bývají neshody v obsahu šťávy, nevrácené nebo neúplně vrácené aroma, přídavek pektinu, hodnoty Brix (poměr cukru a vody), přídavek jiného ovoce, cukru, kyseliny nebo vody [20].

Falšování ovocných šťáv lze rozeznat sledováním mnoha parametrů, od senzorických vlastností přes fyzikální až po obsahy anorganických či organických látek či izotopová zastoupení jednotlivých prvků. Analýza jednotlivých charakteristických komponent může poskytnout cennou informaci o obsahu výrobku. Jedná se o stanovení jednoduchá, jako je sušina, dusík (celkové bílkoviny), popel, cukr, pH, celkových barviv atd, nebo o složitější analýzy. Těmi mohou být metody jako je HPLC, GC, SNIF-NMR a další. U vzorků šťáv je obvyklé nejprve stanovit základní kvalitativní parametry – refraktometrickou sušinu a hlavní cukry. Výsledky jsou porovnány s tabelovanými nebo normovanými hodnotami. Za falšované lze přímo označit ty vzorky, které nevyhovují ve více základních markerech. Vzorky, které nevyhovují nebo jsou mírně odlehle v 1–2 parametrech, je třeba podrobit opakované analýze nebo dalším rozborům. Pokud vzorek šťávy nevyhovuje normovaným hodnotám pro obsah organických kyselin, stává se podezřelým z falšování. Je ale třeba provést další analýzy, aby bylo falšování prokázáno [20].

Snížení obsahu ovocného podílu

Snížení ovocného podílu lze dosáhnout několika způsoby, většinou se jedná o naředění šťávy vodou a přislazení, případně přidavek kyselin. Nedeklarovaný nebo nepovolený bývá sledován přidavek sacharózy nebo různých cukerných sirupů (škrobových hydrolyzátů, řepného nebo třtinového invertního cukru nebo sirupů s vysokým obsahem fruktosy) [22].

Přídavek cukru nebo nízko či středně hydrolyzovaných sirupů lze detekovat pomocí HPLC s refraktometrickou detekcí, neboť přislazením dochází k disproporcím v poměrech cukrů (glukosy a fruktosy nebo zastoupení sacharosy). Přídavek cukerných sirupů, jejichž složení kopíruje přirozené zastoupení cukrů v ovoci, lze zjistit pomocí detekce typických minoritních oligosacharidů (např. pro invertní cukr jsou typické některé trisacharidy, pro fru sirupy maltooligosacharidy). Taková analýza je možná pomocí vysokoúčinné aniontové chromatografie s pulzně amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD), nebo po derivatizaci pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID). Přislazování šťáv je možno zjistit také izotopovou analýzou [20], [22].

Naředění ovocné šťávy vodou lze rozpoznat za pomoci analýzy stabilních izotopů uhlíku $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, kyslíku $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$ a vodíku $^1\text{H}/^2\text{H}$ [22].

Analýza antioxidační aktivity, tedy obsah vitamínů, flavonoidů a dalších látek, které jsou pro jednotlivé druhy ovoce charakteristické v určitém množství, je další možností. Lze používat například metody senzorické, chromatografické, biochemické, molekulárně biologické nebo spektroskopické [20].

Náhrada dražších druhů ovoce levnějšími

Levnějšími variantami bývají často koncentráty nebo šťávy z hroznového vína nebo jablek. Přidány mohou být do šťáv z malin, borůvek, ostružin, pomerančů i grapefruitů [1].

V případě citrusových plodů zde hraje roli často nižší cena grapefruitů než pomerančů a fakt, že oba druhy ovoce při zpracování alespoň částečně sdílí zařízení. Pomerančovou šťávu lze od grapefruitové rozeznat pomocí profilu flavonoidních glykosidů. Šťáva z pomeranče (*Citrus sinensis*) obsahuje hesperidin a narirutin a malá množství neohesperidinu a naringinu. Šťáva z grapefruitu (*Citrus paradisi*) obsahuje všechny čtyři jmenované glykosidy, nejvíce z jich naringin. Směs šťáv z těchto druhů lze tedy od čisté pomerančové šťávy rozeznat díky množství přítomného naringinu [22].

Přídavky pulp wash

Přídavek dužniny do ovocné šťávy je nejčastější u citrusových výrobců. Jednat se může o přídavek šťávy získané extrakcí výlisků ke šťávě z prvního lisování nebo o přípravu rekonstituovaného nápoje pouze z koncentrátu pulp wash nebo ze směsi pulp wash a koncentrátu šťávy [22].

Nenavrácení nebo neúplné navrácení aroma

Pro detekci nevráceného aromatu do ovocné šťávy je nejvhodnější analýza oněch typických aromatických sloučenin pomocí plynové chromatografie [22].

2.3 Metody stanovení organických kyselin

Autenticitu výrobku lze ověřovat mnoha způsoby a jedním z nich je analýza organických kyselin. Možnostmi jejich analýzy se zabývají následující kapitoly. V této diplomové práci jsou organické kyseliny analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je podrobněji popsána v kapitole 2.4.

2.3.1 Celková kyselost

Pro stanovení celkové kyselosti lze použít titrační metody. Nevýhodou je, že výsledek může být pozitivně ovlivněn přítomností aditiv jako například kyseliny benzoové, kyseliny sorbové, oxidu siřičitého atd. Pro orientační údaj o celkovém obsahu kyselin v ovocných šťávách je tato metoda vhodná [23].

Normovaná metoda pro stanovení titrační kyselosti v ovocných a zeleninových šťávách je dána normou ČSN 56 0418, kterou se stanoví míra obsahu minerálních a organických kyselin. Jedná se o potenciometrickou titraci roztokem hydroxidu sodného do hodnoty pH 8,1. Vzorky se obvykle neupravují, pokud je to nutné, analyt se naředí. pH je měřeno kalibrovaným pH metrem při teplotě 20 °C. Výstupem je po přepočtu hodnota titrační kyselosti vyjádřená v mmol H^+ na litr výrobku. Titrační kyselost lze také vyjádřit jako obsah kyselin, pro jednotlivé kyseliny jsou v normě uvedeny faktory. Faktor pro kyselinu vinnou je 0,075, pro kyselinu jablečnou 0,067 a pro bezvodou kyselinu citronovou 0,064 [24].

2.3.2 Elektromigrační metody

Kapilární elektroforéza je k analýze nízkomolekulárních organických kyselin vhodná pro svoji schopnost separace malých molekul i z komplexnějších maticí bez složité úpravy vzorku, což je umožněno rychlou migrací malých molekul a promytím kapiláry po každé analýze. Úprava vzorku se tedy skládá z ředění, filtrace a centrifugace, případně přidavku EDTA pro uvolnění organických kyselin z komplexů s ionty. Vzorky jako je pivo, syčené nápoje a víno je zapotřebí odvdušnit a některé další matrice vyžadují jednoduché specifické kroky, například SPE extrakci. Výhodou je možnost detekce pomocí měření absorpance při 200 nm a méně díky práci ve vodném prostředí a nízká spotřeba vzorku pro analýzy. Organické kyseliny nenesou jiný chromofor, který by při 200 nm absorboval, než karboxylovou skupinu. Takovou hodnotu vlnové délky lze měřit jen ve vodných médiích. Elektroosmotických podmínek je dosaženo umístěním anody na výstup z kapiláry a přidavkem základního elektrolytu (BGE). Nevýhodou může být detekce, běžně používaný UV detektor zde může mít vysoké meze detekce z důvodu malého objemu vzorku. UV detektor lze nahradit detekcí hmotnostně-spektrometrickou, čímž metoda získává identifikační schopnost srovnatelnou s například s GC/MS [28].

Takto bylo pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí při 200 nm separováno 25 organických kyselin, mezi nimi například i kyselina jablečná, fumarová, mléčná, vinná, octová a citronová. Jmenované kyseliny byly stanoveny i v reálných vzorcích ovocných šťáv po zředění vodou a filtraci přes 0,45 μm filtr, detekce probíhala při 249 nm [28].

2.3.3 Chromatografické metody

HPLC

Analýza organických kyselin se běžně provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Lze použít analýzy na systému normálních fází, častěji se používá fází reverzních. RPLC analýza organických kyselin je podrobněji popsána v další kapitole. Detekce se využívá nejčastěji UV, vodivostní nebo hmotnostně spektrometrická. Používá se také chromatografie iontové výměny a plasmaspay LC [23].

GC

Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí je metoda běžně používaná například pro analýzu nízkomolekulárních organických kyselin k diagnóze metabolických poruch. Je citlivá, selektivní a má nízké meze detekce, nevýhodami pro dané použití zůstává dlouhá doba přípravy vzorku [29].

2.3.4 Enzymatické metody

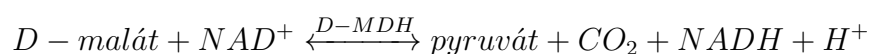
Enzymatické metody jsou velmi specifické a přesné, lze pomocí nich analyzovat i konkrétní optické izomery. Analýza je rychlá a spotřeba analytu nízká. Výraznou nevýhodou je jejich vysoká cena, případně náročnost přípravy enzymu, a tak se využívají nejčastěji v klinických laboratořích, někdy také jako referenční metody při zavádění metod jiných. Reakce může být ovlivněna přítomností inhibitorů, stářím enzymu nebo kontaminací systému. Detekce může být provedena například spektrofotometricky nebo fluorescenčně. Ze spektrofotometrických metod se nejvíce používá UV detekce. NADH a NADPH absorbují ve svých redukovaných formách, na rozdíl od forem oxidovaných, které neabsorbují. Oxidoreduktázy, které využívají NADH jako substrát, mohou být tedy stanoveny díky spotřebě koenzymu a poklesu UV absorbance při vlnové délce 340 nm. Fluorometrická detekce je citlivější, ale hrozí zde interference. NADH a NADPH, redukované formy, fluoreskují a oxidované formy ne. Oxidační reakce jsou v důsledku toho doprovázeny poklesem fluorescence, redukční reakce způsobují naopak nárůst [30], [31].

Normované jsou enzymatické metody pro stanovení kyseliny D-jablečné (ČSN 56 0429), L-jablečné (ČSN 56 0409), D-isocitronové (ČSN 56 0410), dále D a L-mléčné (ČSN 56 0422) a citronové. Některé z těchto metod jsou popsány níže; podstata je však u všech obdobná.

Normy specifikují metodu enzymového stanovení obsahu daných kyselin, přítomných v ovocných a zeleninových šťávách ve formě kyselin nebo solí. Principem metody je enzymová přeměna (např. L-malátu na oxalacetát) a spektrofotometrické měření současně redukce nikotinamidadeninukleotidu při pH 10,0.

Enzymatické stanovení kyseliny D-jablečné

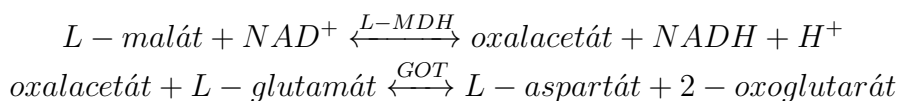
Kyselina D-jablečná se oxiduje beta-nikotinamidadeninukleotidem (NAD) za přítomnosti D-malátdehydrogenasy dekarboxylační (D-MDH) na oxalacetát, který se poté rozkládá na pyruvát a oxid uhličitý.



Vzniklé množství NADH (měřené na základě zvýšené absorbance roztoku v ultrafialové oblasti) je ekvivalentní k množství D-malátu v analyzovaném vzorku [25].

Enzymatické stanovení kyseliny L-jablečné

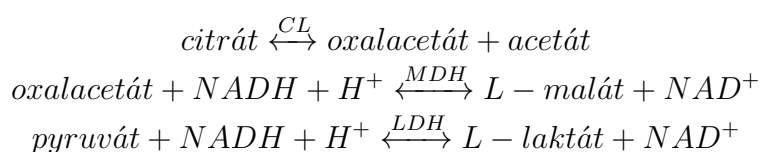
Metoda je založena na enzymové přeměně L-malátu na oxalacetát a spektrometrickém měření současné redukce nikotinadeninukleotidu při pH 10,0.



Množství vytvořeného NADH (zvýšená absorbance) je ekvivalentní množství kyseliny L-jablečné [26].

Enzymatické stanovení kyseliny citronové

Metoda je založena na enzymové přeměně citrátu na oxalacetát při pH 7,8.



Množství vytvořeného NADH (pokles absorbance) je ekvivalentní množství kyseliny citronové [27].

2.4 Analýza organických kyselin pomocí HPLC

Chromatografie je separační proces založený na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) (IUPAC 1993).

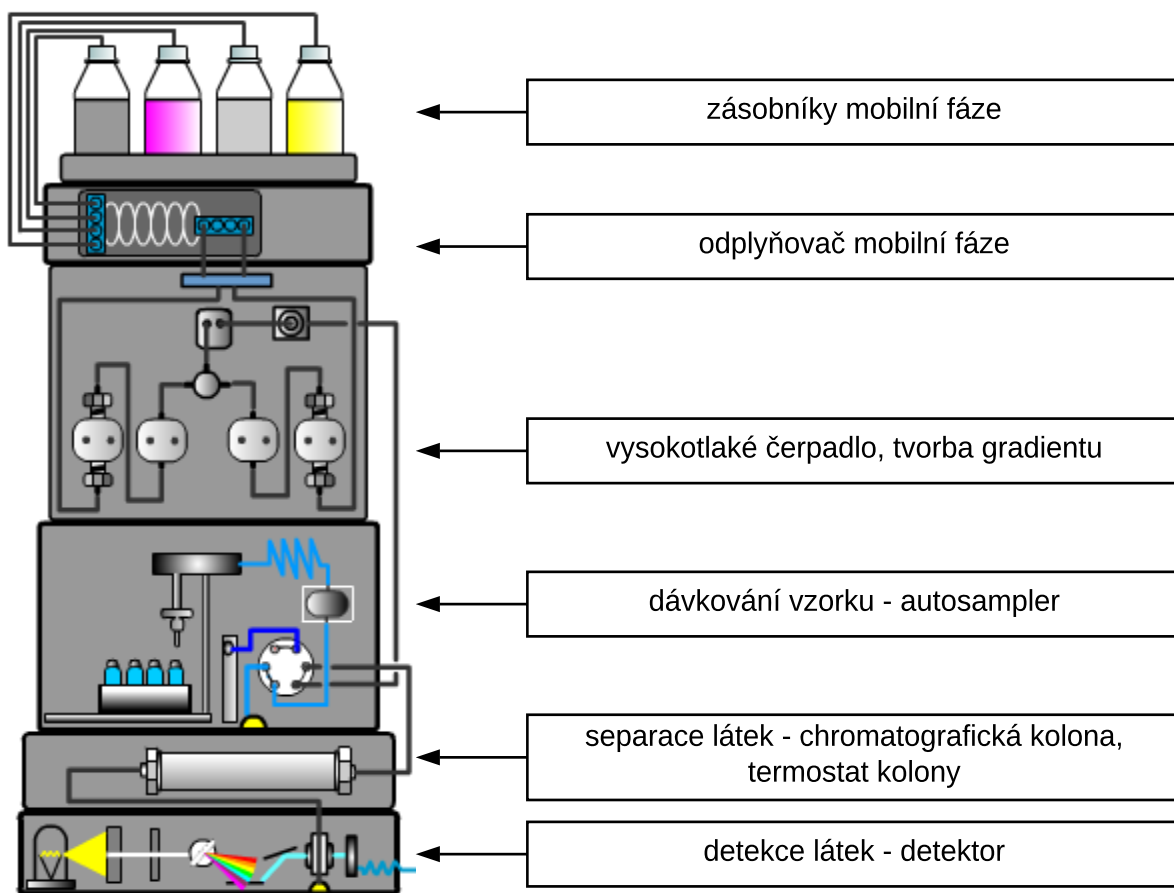
2.4.1 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí zastávajících konkrétní funkce. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na *obrázku 2.1*.

Retenční charakteristiky a účinnost chromatografické kolony

Retenční (eluční) čas t_R je základní charakteristickou veličinou pro každou dělenou látku. Lze také použít vyjádření retenční (eluční) objem V_R . Retenční čas udává informaci o době od nástřiku po maximum eluční křivky, neboli po vrchol píku, viz *obrázek 2.2*. Objem mobilní fáze, která proteče za tuto dobu kolonou, se nazývá retenční objem. T_R slouží při chromatografické separaci jako kvalitativní charakteristika látky. Pro kvantitativní charakteristiku slouží údaj o ploše pod píkem (A) nebo výška píku (h). Platí vztah $V_r = F_m \cdot t_R$, kde F_m je objemový průtok mobilní fáze [33].

Účinnost chromatografické kolony lze charakterizovat pomocí míry rozšiřování elučních zón dělených na koloně. Kvalitu chromatografické separace lze popsat bezrozměrnou veličinou účinnosti kolony N , která vyjadřuje počet teoretických pater kolony. Ten závisí na retenčním faktoru dané složky, stavu stacionární fáze a na dalších parametrech, pro určitou kolonu není konstantní. Počet teoretických pater je závislý na délce kolony (L), retenčním faktoru V_r nebo retenčním čase t_r , rychlosti průtoku mobilní fáze (u), velikosti částic náplně kolony (d_p), teplotě (T) a viskozitě mobilní fáze (η). Prakticky se využívá stanovení počtu teoretických pater podle rovnice $N = \text{konst}(V_r/w)^2$, kde w je šířka píku v jeho příslušné výšce [33].



Obrázek 2.1: Schéma HPLC systému [32].

2.4.2 Mobilní fáze

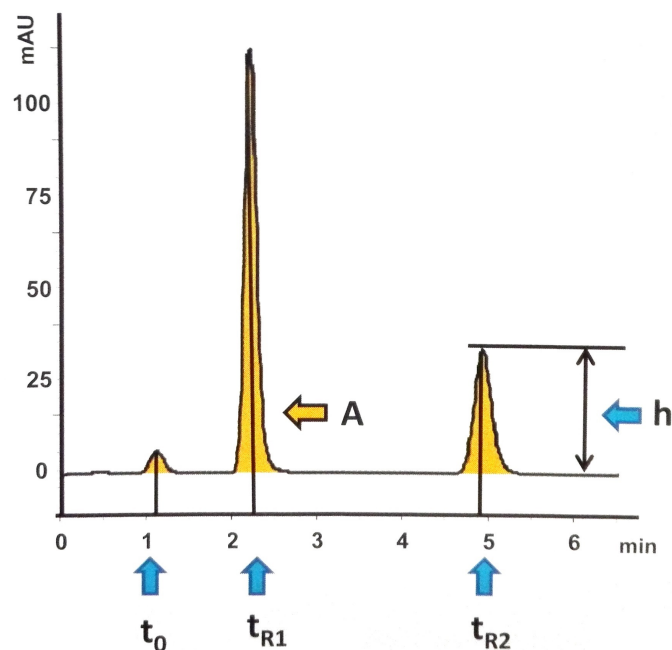
Mobilní fází, tedy pohyblivou složkou chromatografického systému, je v kapalinové chromatografii kapalné rozpouštědlo, které unáší složky vzorku přes stacionární fázi, na které dochází k jejich separaci [33].

První část HPLC systému slouží k přípravě mobilní fáze a dávkování vzorku. Obvykle se zde nacházejí zásobníky mobilní fáze, odplyňovač, vysokotlaké čerpadlo, tlumič pulsů a směšovač mobilních fází.

Transport mobilní fáze

Zásobníky mobilních fází obsahují speciální filtry, které zachycují suspendované tuhé částice před vstupem do systému. Je nutné dobré uzavření zásobníků, aby bylo umožněno odtékání kapaliny a zároveň zamezeno unikání par do okolí a kontaminování mobilní fáze. Spojení mezi zásobníkem mobilní fáze a dalšími částmi (odplyňovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem) bývají z teflonu nebo nerezové oceli [33].

Odplynění mobilní fáze je nutné především proto, že na výstupu z chromatografické kolony nastává změna tlaku. To může způsobit uvolnění bublinek rozpuštěného plynu a vést k problémům s HPLC systémem. Při odplynění mobilní fáze jsou eliminovány problémy jako je nestabilita základní linie (baseline), neopakovatelnost retenčních časů, špatná opakovatelnost dávkovaného objemu vzorku nebo nestabilita provozu čerpadel. Rozpuštěné plyny mají vliv i na funkci detektorů. Současně je používáno odplyňování



Obrázek 2.2: Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu. t_R - retenční časy látek, t_0 - retenční čas nezadržované složky, A - plocha píku, h - výška píku [33].

probubláváním heliem nebo pomocí vakuového degaséru. Použití vakuového odplyňovače je dnes účinnější a levnější, proto více používané. Ve vakuové komoře je umístěna polo-propustná kapilára, přes kterou prochází mobilní fáze. Ta propouští pouze plyny, které díky rozdílu tlaků vně a uvnitř kapiláry kontinuálně přecházejí do vakua [33].

Tlumiče tlakových pulsů jsou nutné u systémů s jednoduchými i dvoučinnými čerpadly, kdy dochází k sinusovým tlakovým pulsům. Tyto pulsy je částečně možné odstranit zařazením další hlavy pracující v opačné fázi. Lze také použít čerpadlo se speciálně programovaným pohybem pístu a získáním lichoběžníkového profilu v kombinaci se synchronizovaným druhým pístem dosáhnout téměř vodorovného profilu. Tlumič pulsů pracuje na principu zachycování tlakových rázů pomocí odporových nebo kapacitních elementů [33].

Čerpadlo zajišťuje především stabilní průtok mobilní fáze, což vede k přesným kvantitativním výsledkům, stabilním retenčním časům a nízké úrovni šumu. Vysokotlaká čerpadla fungují buď za konstantního tlaku nebo konstantního objemového průtoku. Mobilní fáze je u obou vytlačována ze zásobníku pístem či membránou, rozdíl u čerpadel je ve způsobu dosažení pohybu pístu. Čerpadla pracující s konstantním tlakem využívají tlaku plynu nebo hydraulické kapaliny na píst čerpadla, zatímco u čerpadel pracujících s konstantním objemovým průtokem je k pohybu pístu využíván mechanický pohon. Čerpadla mohou být pneumatická, injekčního typu, pístová, membránová nebo dvoupístová [33].

Tvorba gradientu mobilní fáze probíhá buď nízkotlakově, nebo vysokotlakově. Nízkotlakový gradient je tvořen smísením složek mobilní fáze za atmosférického tlaku v malé směšovací komůrce a následným vstupem do vysokotlakého čerpadla. Gradient je tvořen s vysokou přesností, ale vyžaduje dokonalé odvdoušnění mobilní fáze a sladění pracovních period ventilů. Nízkotlaký gradient je přesný, ale časově se zpožďuje. Je nutné dokonalé odvdoušnění mobilní fáze a sladění pracovních period ventilů. Vysokotlaký gradient je méně

přesný, ale nastává jen malé zpoždění gradientu. Nevýhodou je nutnost použití dvou a více vysokotlakých čerpadel [33].

Dávkování vzorku

Dávkování vzorku na chromatografickou kolonu je jedním ze zásadních kroků, které mají vliv na účinnost chromatografického procesu. Zejména při použití mikrokolon, kapilárních a krátkých kolon je důležitá dokonalost dávkování vzorku, aby nedocházelo k rozmývání píků. V současnosti jsou používány manuální smyčkové dávkovače (na principu přepínacích ventilů) nebo autosamplery (automatické dávkovače) [33].

Vysokotlaké dávkovací ventily umožňují dávkování při tlaku až 80 MPa. Objemy dávkovacích smyček jsou od 0,2 μl do 2 000 μl , ovládání je elektrické nebo pneumatické [33].

Automatické dávkovače - autosamplery jsou zařízení široce využívaná v analytických laboratořích pro zlepšení přesnosti vstřikování a pro možnost práce bez dozoru; redukuje se tak náklady na analýzu vyžadující manuální vstřikování. Autosampler je spojen se zásobníkem vzorků. Mikronádobky (vialky) jsou uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Vialky mohou být různého objemu a v případě omezeného množství vzorku se do nich vkládá ještě tzv. insert, který má ještě menší objem (stovky mikrolitrů). Většina autosamplerů využívá šestiportový vstřikovací ventil. V moderních autosamplerech je rotor poháněn elektrickým motorem, ve starších modelech pomocí stlačeného vzduchu. Mezi základní komponenty patří vstřikovací ventil, injekční nebo vzorkovací jehla, smyčka o daném nebo nastavitelném objemu, dávkovací čerpadlo pro natažení vzorku z vialky a vstupní port, přes který je vzorek nanášen na smyčku [32], [33].

2.4.3 Stacionární fáze

Stacionární, tedy nepohyblivá fáze chromatografického systému, je náplň chromatografické kolony, na které dochází k vlastnímu separačnímu procesu [33].

Současné kolony pro HPLC jsou připravovány výhradně komerčně. Uživatel vybírá pouze konstrukci, rozměry a tvar chromatografické kolony, druh sorbentu a velikost částic. Plášť kolony bývá většinou vyroben z nerezové oceli; musí odolávat vysokým tlakům (až 100 MPa), chemickému působení mobilní fáze a musí být pokud možno dokonale hladký. Nejvyužívanější jsou dnes kolony o vnitřním průměru 2,1–5 mm, délce 10–300 mm a s náplněmi o velikosti částic 1–10 μm [33].

Konstrukce kolony musí být především těsná, neboť kolona musí odolávat vysokým pracovním tlakům i tlaku vlastní náplně. Kolona je složena z kovového pláště uzavřeného porézní kovovou fritou, která brání uvolňování stacionární fáze a mobilní fázi umožňuje plynulý průtok. Na obou koncích kolony je ochranný kroužek a koncová hlavice, ve které je vstup pro kapiláru. Kolona je s dávkovačem a detektorem spojena kovovými nebo PEEK (polyetherketonovými) spojkami a ferulkami (hydraulickými spojkami) [33].

Tok mobilní fáze kolonou lze posuzovat na základě objemu mobilní fáze mezi částicemi náplně, objemu mobilní fáze uvnitř pórů částic a objemu skeletu náplně. Tyto tři složky tvoří objem kolony a umožňují sledovat, jaký je celkový objem mobilní fáze v koloně a jaký je objem stagnující mobilní fáze (mobilní fáze uvnitř pórů částic). Operovat lze také s hodnotami porozity mezi zrny náplně, porozity uvnitř zrn a celkové porozity [33].

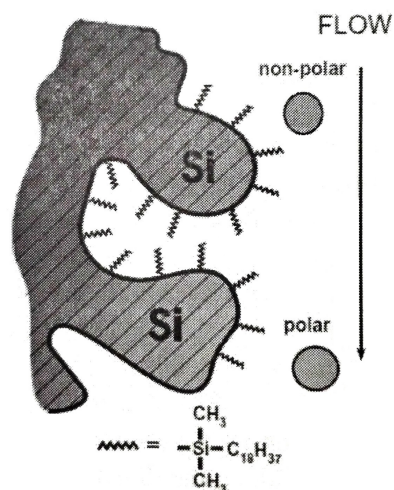
Teplotní gradient vzniká na koloně třecím teplem. Mobilní fáze při průtoku čelí přeměně vlastní mechanické energie na tepelnou a vzniká tak teplotní gradient axiální nebo radiální. Axiální teplotní gradient vzniká působením nekonstantní teploty stěny kolony a vyvolává ohřev kolony směrem k jejímu výstupu. Radiální teplotní gradient vzniká napříč průřezem kolony působením rozptýlu třecího tepla, teplota v plášti kolony je nižší než v jejím centru [33].

Termostat je důležitou složkou, pomocí které lze zabránit vzniku teplotního gradientu a předejít tak významné ztrátě účinnosti HPLC systému. Termostaty se používají kapalinové a teplovzdušné. Termostat zajišťuje rovnoměrnou distribuci teploty a brání lokálním teplotním výkyvům [33].

System s reverzními fázemi

K analýze organických kyselin lze využít jak systému s normálními fázemi, tak fází reverzních. V této diplomové práci jsou organické kyseliny separovány na reverzních fázích, tedy chromatografickém módu, při němž je stacionární fáze méně polární než mobilní fáze.

Stacionární fáze, nepohyblivá složka chromatografického systému, může být tuhá látka nebo film kapaliny zakotvený či chemicky navázaný na tuhé matrici, tzv. nosiči. Tvoří náplň chromatografické kolony, na níž se odehrává vlastní separační proces. Nejrozšířenějším polárním anorganickým sorbentem je silikagel pro svoji mechanickou stabilitu, snadnou derivatizaci a řízení velikosti částic, porozitu a nestlačitelnost. Chemickým navázáním ligandů se stává vhodným pro chromatografické separace na reverzních fázích. Na hydroxylové, respektive silanolové skupiny, které jsou aktivními centry na povrchu silikagelu, je možné chemicky navázat stacionární fázi vybraných vlastností. Chemicky vázané fáze bývají často alkylové řetězce různé délky (C2–C30), vhodné pro polární i nepolární analyty. Nejrozšířenější je oktadecylsilikagel (C18, ODS) [33], [34], [35].



Obrázek 2.3: Znázornění separace polárních a nepolárních látek na RP-HPLC [34].

Při analýze polárních látek je nutné používat prakticky pouze vodné mobilní fáze a zabránit tak příliš rychlé eluci. Při použití klasické reverzní C18 stacionární fáze v kontaktu s organickou složkou mobilní fáze jsou hydrofobní řetězce v napřímené poloze k dispozici pro interakci. V případě použití mobilní fáze s pouze vodnou organickou složkou mohou být hydrofobní řetězce smáčeny kvůli velkému rozdílu v polaritě. Může tak nastat

zhroucení řetězců C18 a narušení funkce stacionární fáze. Tento stav se nazývá hydrofobní kolaps. Tomuto riziku lze předcházet několika způsoby. Pro analýzu polárních látek s využitím vodných mobilních fází musí reverzní stacionární fáze obsahovat i jiné prvky (krátké alkylové řetězce bez pokrytí volných silanolových skupin, hydrofilní polárně endcappované stacionární fáze, vložené polární fáze, dlouhé alkylové řetězce nebo velký průměr pórů stacionární fáze) [33], [34].

Pro reverzní stacionární fáze jsou charakteristické interakce pouze slabými disperzními silami, tedy nespecifickými mezimolekulovými interakcemi analyt-adsorbent. Nevyskytují se zde totiž aktivní adsorpční centra schopná polárních interakcí. Tyto nespecifické interakce jsou v porovnání s polárními interakcemi mnohem slabší a jsou jimi ještě zeslabovány. Polární interakce usnadňují návrat molekul analytů do objemu polárního elučního činidla. Čím nižší je polarita organického rozpouštědla, tím vyšší je eluční síla mobilní fáze. Podle rostoucí eluční síly lze některá organická rozpouštědla seřadit následovně:

voda < methanol < acetonitril < propan-2-ol < dioxan < tetrahydrofuran

Čím hydrofobnější je analyt, tím delší je jeho retenční doba (obrázek 2.3). Silně polární a iontové látky jsou na nepolárních fázích zadržovány velmi slabě nebo vůbec ne. Eluují potom v mrtvém objemu kolony nebo dříve. Píky jsou deformované a může docházet k jejich štěpení a vzniku tzv. dvojitého píku. Volbou pH mobilní fáze je možné chování látek iontové povahy ovlivnit. Potlačení disociace organických kyselin lze dosáhnout změnou pH mobilní fáze na hodnotu asi 2–5. Úprava pH na hodnotu blízkou pKa analytu působí výrazné změny v retenci a selektivitě. Stupeň ionizace je ovlivněn také teplotou kolony [33], [35].

2.4.4 Detekční systémy

Detektor slouží k rozeznání a záznamu rozdílu signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Detektory lze rozdělit na koncentrační a hmotnostní, nebo dle jiných kritérií na nedestrukční a destruktivní. Koncentrační detektor reaguje na změnu dm/dV , tedy na hmotnostní koncentraci v effluentu, zatímco hmotnostní detektor reaguje na změnu dm/dt , tedy na hmotnostní tok složky v effluentu. Destrukční detektor způsobuje ireverzibilní změny detekovaných komponent, zatímco nedestrukční žádné chemické změny nepůsobí [33].

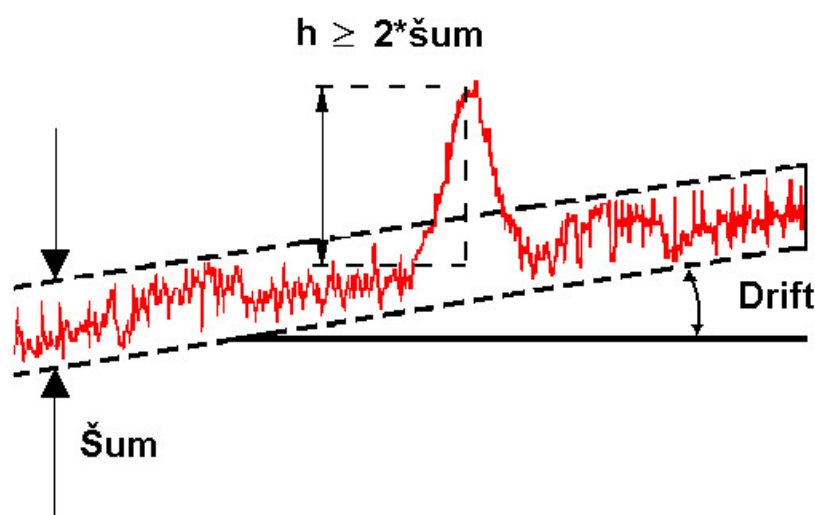
Mezi univerzální HPLC detektory patří detektor refraktometrický, CAD a ELSD. Pro detekci specifických vlastností vzorku jsou vhodné UV-VIS detektory, fluorescenční, elektrochemické, radioaktivní a vodivostní. K detekci změny mobilní fáze lze použít CAD, MS a ELSD detektory; připojením nezávislé analytické metody k HPLC lze aplikovat detekci pomocí MS, NMR a dalších [33].

Důležitými parametry detektoru jsou citlivost, předvídatelnost, odezva, univerzálnost, specifita, linearita, nedestruktivnost, spolehlivost a snadnost použití, nezávislost signálu na složení mobilní fáze a změně teploty a průtoku, kvalitativní informace pro detekované píky a příspěvek detektoru k mimokolonovému rozmývání elučních zón [33].

Šum a drift

Šum (noise) vyjadřuje nepravidelnosti ve změnách signálu detektoru jako amplitudu základní linie. Šum mohou způsobovat různé faktory, nejčastěji změna elektrického signálu, nestabilita lampy detektoru, vlastnosti detekční cely nebo teplotní fluktuace. Šum významně limituje citlivost detektoru, měří se obvykle od vrcholu malého píku k úpatí druhého píku. Spolehlivé kvalitativní vyhodnocení je možné, pokud je výška píku alespoň trojnásobkem výšky šumu (mez detekce), kvantitativní hodnocení lze provést, pokud je

výška píku alespoň desetinásobek šumu. K označení poměru signálu a šumu se používá S/N. Drift je vyjadřován jako průměrný sklon obálky šumu za hodinu a poukazuje na dlouhodobou nestabilitu základní linie. Obvykle jej způsobuje změna teploty detektoru v průběhu první půlhodiny provozu, nebo gradientová eluce, kde bývá přirozeným jevem. Na *obrázku 2.4* je znázorněn šum a drift na základní linii [33].



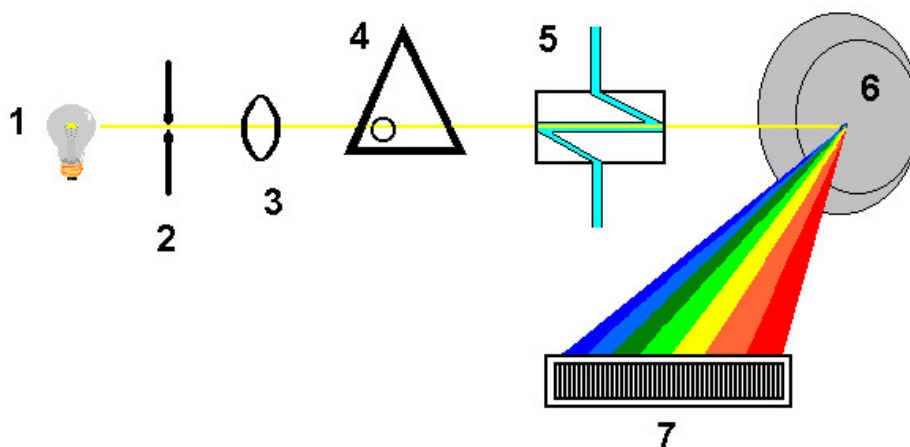
Obrázek 2.4: Šum a drift na základní linii [33].

Důvodem nestability základní linie bývají většinou heterogenity eluátu, nejčastěji vzduchové bublinky, kterým lze předcházet dokonalým odplyněním mobilní fáze. Další příčinou mohou být změny tlaku, rychlosti průtoku nebo teploty mobilní fáze. Nestability základní linie většinou nepůsobí detektor sám, ale je důležité, jak citlivě na změny reaguje [33].

Spektrofotometrické detektory jsou jedny z nejvyužívanějších detektorů pro HPLC. Pracují na principu absorpce záření vlnových délek od 190 do 899 nm (UV oblast je 190–400 nm). Pomocí Lambert-Beerova zákona je možné kvantitativní spektrofotometrické vyhodnocení. Lambert-Beerův zákon vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy l , koncentrací absorbující složky c a velikostí absorbce, která je vyjádřena jako absorbance A [33]. Spektrofotometrické detektory mohou mít fixní či měnitelnou nebo programovatelnou vlnovou délku, hojně využívány jsou také detektory s diodovým polem (PDA, photodiode-array detector nebo také DAD, diode array detector), které v reálném čase snímají celé spektrum. Schéma PDA detektoru je na *obrázku 2.5*. Spektrofotometrické detektory jsou selektivní a mají velmi vysokou citlivost [33].

Fluorescenční detektory fungují na principu měření sekundárního emisního záření. To je vydáváno látkou, která absorbovala primární excitační elektromagnetické záření. Jednoduché fluorescenční detektory detekují fluorescenční záření při všech vlnových délkách současně, zatímco modernější systémy umožňují nastavení vlnové délky excitačního i emitovaného záření pomocí monochromátoru. Vlnové délky lze programovat v průběhu eluce, čímž je možné dosáhnout maximální citlivosti pro jednotlivé separované látky. Díky možné miniaturizaci objemu průtokové cely detektoru lze použít fluorescenční detektory i v mikrokolonové kapalinové chromatografii [33].

Elektrochemické detektory sledují závislost mezi koncentrací sledované složky a elek-



Obrázek 2.5: Schéma detektoru s diodovým polem. (1) deuteriová výbojka, (2) štěrba, (3) čočka, (4) clona, (5) průtoková Z-cela detektoru, (6) konkávní holografická mřížka, (7) diodové pole [33].

trickou veličinou. Mají poměrně úzký rozsah aplikací, používají se především k analýze léčiv, polutantů a přírodních produktů. Pomocí elektrochemických detektorů jsou měřeny veličiny jako je elektrodový potenciál nebo proud, vyvolané průtokem látky celou detektorem. Látkové množství detekované složky je přímo úměrné měřenému elektrickému signálu. Rozlišovány bývají metody potenciometrické a elektrolytické [33].

Univerzální detektory na bázi aerosolu jsou schopny detekovat analyt bez ohledu na jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Patří sem ELSD (evaporative light scattering detector, odpařovací detektor rozptylu světla), CAD (charged aerosol detector, Corona) a NQAD (nano quantity analyte detector). Detekce probíhá ve třech fázích: zmlžování HPLC eluentu pomocí proudu dusíku, odpaření mobilní fáze ve vyhřívané části detektoru a samotná detekce [33].

Refraktometrické detektory jsou nejstarší používané univerzální detektory. Jejich nevýhodou je teplotní závislost odezvy, nízká citlivost, nutnost konstantního průtoku bez pulsů a nemožnost použití pro gradientovou eluci. Podle konstrukce lze rozlišit detektory deflexní (výchylkové) a reflexní (Frenselovy) [33].

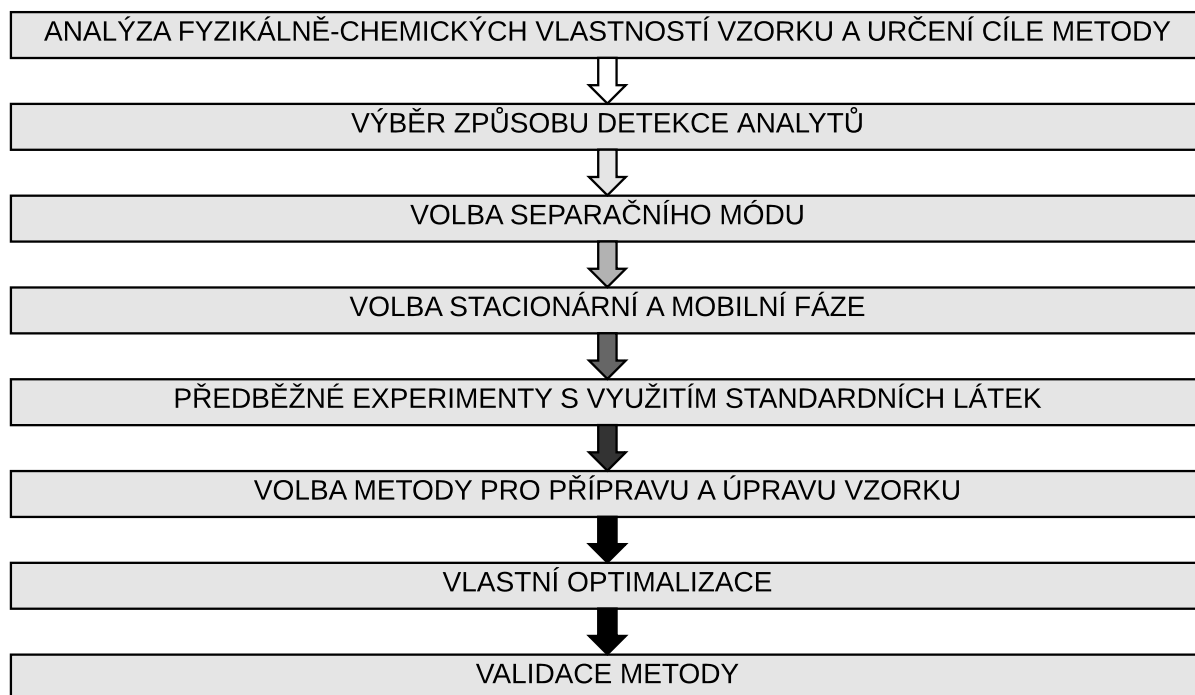
Vodivostní detektory měří vodivost eluátu v průtokové cele pomocí dvou elektrod, do nichž je přiváděno střídavé napětí. Průtoková cela může být miniaturizována až na 5 mikrolitrů a konstrukce detektoru je nenáročná. Vysoké nároky jsou kladeny na mobilní fázi, která by měla být nevodivá a mít velkou permitivitu. Vodivostní detektory patří mezi detektory univerzální [33].

Hmotnostně spektrometrické detektory jsou dnes nejvíce užívanými detektory (asi 30%). Použití MS detektoru navíc umožňuje získání spektrálních údajů o identitě látky. Použít lze iontovou past, kvadrupol i TOF, případně hybridní systémy QqQ, TOF/TOF nebo Q/TOF [33], [40].

2.5 Validace metody HPLC

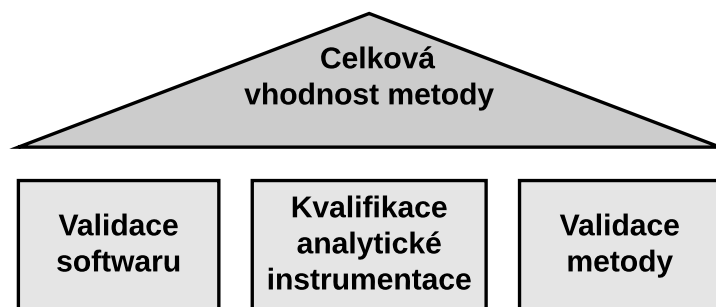
Validace je proces získání důkazu ve formě dokumentace, poskytující vysoký stupeň jistoty o schopnosti určitého procesu trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. Jde o prokázání vhodnosti určitého postupu pro zamýšlené použití, či o proces určování vhodnosti daného systému pro získání relevantních dat. V současnost je validace mnoha analytických metod v rámci systémů kontroly kvality téměř nezbytností [36], [37].

Validaci lze považovat za poslední krok při vývoji a optimalizaci metody. Kroky, které jsou obvykle realizovány u HPLC metod, jsou znázorněny na *obrázku 2.6*.



Obrázek 2.6: Kroky ve vývoji a optimalizaci HPLC metody [36].

Validace analytických metod může zahrnovat několik základních pohledů. Pro kompletní validaci analytické metody je třeba je vzít v úvahu. Jedná se o validaci používaného softwaru, kvalifikaci použité analytické instrumentace, samotnou validaci metody a nakonec zhodnocení vhodnosti systému metody jako celku (znázorněno na *obrázku 2.7*).



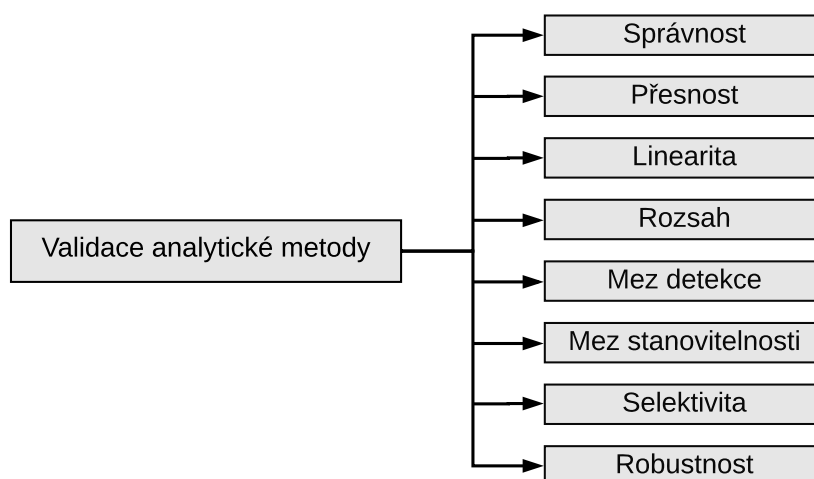
Obrázek 2.7: Základní kroky ve validačním procesu [38].

Validace softwaru obsahuje hodnocení chyb, které vznikají kvůli nedokonalostem v jeho vývoji. Verifikace softwaru vždy neodhalí chyby, které při praktickém použití přispívají k chybám metody. Kontrola vývoje softwaru by měla být prováděna ještě pečlivěji než kontrola hardwaru z důvodu jeho komplexnosti, a to ideálně již při vývoji, kdy je odhalování a oprava chyb snadnější [38], [39].

Kvalifikace analytického přístroje může zahrnovat parametry týkající se designu a instalace přístroje. Po instalaci lze hodnotit například přesnost průtoku čerpadla, přesnost tvorby gradientu, přesnost injektoru, termostat a teplotou autosampleru, přesnost vlnové délky a linearitu detektoru [38].

Celková vhodnost systému by měla sloužit ke zhodnocení integrity systému a vhodnosti pro dané analytické využití. Vybavení, elektronika, analytické operace a vzorky by měly dohromady tvořit komplexní systém, který lze hodnotit i jako celek [38].

Validací analytických metod se podrobně zabývá řada směrnic různých organizací, např. FDA (Food and Drug Administration) nebo IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Validační dokumentace by měla zahrnovat validační protokol, analytickou zkušební metodu a validační report. Správné provedení validace předpokládá výběr vhodných validačních parametrů. Těmi mohou být některé parametry ze znázorněných na *obrázku 2.8* a popsané v následujících kapitolách [38].



Obrázek 2.8: Validační parametry [36].

2.5.1 Správnost metody (accuracy)

Správnost metody vyjadřuje těsnost shody mezi výsledkem měření (result of measurement) a přijatou referenční hodnotou (accepted reference value). (Nováková, Douša, 2013, str.143)

Správnost metody lze stanovit jako procento analytu, který prošel metodou. Stanovení správnosti vyžaduje analýzu známého množství analytu, případně známého přídatku. Pokud nejsou dostupné referenční standardy, lze správnost stanovit pouze srovnáním s jinou validovanou metodou [38].

Chyba výsledku (error of result)

Chyba výsledku je rozdíl mezi hodnotou zjištěnou měřením a přijatou referenční hodnotou. Rozlišit lze systematickou a náhodnou chybu výsledku. Systematická neboli soustavná

chyba (systematic error of result) je charakteristická konstantní nebo předvídatelně se měnící složkou chyby v průběhu řady výsledků zkoušek. Náhodná chyba (random error of result) je naopak taková chyba, jejíž složka se v průběhu řady výsledků zkoušek mění nepředvídatelným způsobem a nelze ji žádným způsobem odstranit [36].

Odchylka (bias)

Odchylka (vychýlení) je rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a střední hodnotou výsledků zkoušek. Může dosahovat kladných nebo záporných hodnot a je charakteristikou systematické chyby. Vychýlení může být někdy vyjádřeno jako analytická výtěžnost [36], [41].

Výtěžnost

Výtěžnost (návratnost, recovery) vyjadřuje poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě (podíl pozorované a očekávané hodnoty) [36], [41].

2.5.2 Přesnost metody (precision)

Přesnost nemá vztah k referenční hodnotě, je závislá pouze na rozdělení náhodných chyb. Výsledky neovlivněné jakýmkoli předchozími výsledky na tomtéž nebo podobném zkoušeném vzorku jsou nazývány nezávislými výsledky. Kritéria přesnosti metody lze hodnotit jak při krátkém časovém úseku v jedné laboratoři, tak při mezilaboratorních studiích [36], [41].

Přesnost je obvykle hodnocena pomocí třech kritérií: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost [38].

Opakovatelnost metody (repeatability) s_r

Opakovatelnost vyjadřuje schopnost metody poskytovat shodné výsledky během krátkého časového úseku za stejných podmínek. Měla by být určena alespoň z devíti vzorků: tři koncentrační hladiny, tři opakování, nebo z šesti vzorků cílové koncentrace. Podmínkami opakovatelnosti se rozumí podmínky, kdy jsou za opakovaného použití téže zkušební metody v téže laboratoři stejným pracovníkem za použití stejných přístrojů a zařízení na identickém materiálu během krátkého časového rozmezí získány nezávislé výsledky zkoušek [36], [38].

Mezilehlá přesnost metody (intermediate precision) s_{zi}

Mezilehlá přesnost vyjadřuje shodu mezi výsledky z vnitrolaboratorních variací způsobených náhodnými faktory, tedy změnami v průběhu několika dní, změnou analytika nebo změnou vybavení. Jsou to faktory, které popis metody obvykle nezahrnuje, nebo faktory externí. Podmínkami mezilehlé přesnosti jsou stejný postup a místo měření, stejné nebo podobné objekty a rozšířený časový úsek [36], [38].

Reprodukovatelnost metody (reproducibility)

Reprodukovatelnost metody vyjadřuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky, většinou se jedná o výsledky mezilaboratorních zkoušek. Důkaz reprodukovatelnosti by

měl zahrnovat standardní odchylku, relativní odchylku a interval spolehlivosti. Podmínkami reprodukovatelnosti jsou měření stejného analytu ve vzorcích téhož materiálu, stejná metoda a provádění jednotlivých měření za různých podmínek (analytik, přístroj, místo, podmínky, čas) [38].

Krátkodobá přesnost metody (intra-day precision) vyjadřuje přesnost daného postupu v daném čase, na daném přístroji, vykonaného konkrétním pracovníkem. Informace o ní se získají analýzou šesti nezávisle připravených vzorků v souladu s metodou [36].

Dlouhodobá přesnost metody (inter-day precision) je určena směrodatnou odchylkou pro delší časové období (řádově měsíce). Měření se provádějí ve dvou paralelních opakováních na stejném materiálu a koncentrační úrovni jako v praxi [36].

2.5.3 Linearita a rozsah metody

Linearita je schopnost metody poskytnout v daném rozsahu lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. (Nováková, Douša, 2013, str.149)

Při přímkové závislosti je třeba vhodně zvolit kalibrační model a metodu pro vyhodnocení linearity. Pro obecné matematické vyjádření lineární závislosti pro dvě náhodné proměnné je používán vztah: $y = a + bx$, kdy parametr a je posunutí (úsek) na ose y a parametr b je směrnice kalibrační přímky. Významnější nelinearitu lze korigovat pomocí nelineární kalibrační funkce nebo eliminovat zúžením pracovního rozsahu [36], [41].

Pracovní rozsah metody (working range) je validací ověřený uzavřený interval hodnot měřené veličiny ve vzorku, pro který je metoda aplikovatelná [36].

2.5.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, limit of detection) určuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, která může být detekována, ale ne nutně kvantifikována. Odpovídá koncentraci, při které je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Obvykle se určuje pro stanovení spodní hranice pracovního rozsahu metody. Běžně je vyjadřována jako koncentrace analytu v procentech, nebo *ppm* apod., nebo jako poměr *signál : šum* ($S : N - \text{signal} : \text{noise}$). Obvykle je přijatelný $S : N$ poměr mezi 3 : 1 a 2 : 1. Výpočty se provádějí podle vzorce: $DL = 3 \times \sigma / S$, kde σ je standardní odchylka odezvy a S je směrnice kalibrační křivky [36], [38], [41].

Mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification) určuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze za podmínek metody kvantifikovat s přijatelnou přesností. Obvykle je přijatelná hodnota $S : N = 10 : 1$. Výpočty se provádějí podle vzorce: $QL = 10 \times \sigma / S$ [38].

2.5.5 Selektivita metody

Selektivita analytické metody (method selectivity) je schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek. (Nováková, Douša, 2013, str.152)

Testování selektivity analytické metody zahrnuje zkoumání míry odezvy vůči konkrétnímu analytu, studii vlivu interferentů a určování jejich významnosti. Může probíhat porovnáním kalibračních přímek, porovnáním výsledků se standardem, nebo porovnáním výsledků s měřením bez intereferentů [36].

Selektivita HPLC metody

Prokázání selektivity v HPLC metodách lze provést pomocí detekce, změnou chromatografických parametrů metody nebo pomocí stresových testů [36].

Detekci lze využít k prokázání selektivity změnou vlnové délky UV detekce směrem k hodnotám, při kterých již matrice neinterferuje a zároveň je odezva analytu ještě dostatečná. Porovnávat UV spektra či prokázat spektrální čistotu píku lze pomocí detektoru diodového pole za využití vhodného softwaru [36].

Chromatografické podmínky separace (stacionární fáze, mobilní fáze) lze měnit tak, aby proběhla separace všech sledovaných látek. Následně jsou látky kvantifikovány a je-li prokazována shoda s předchozími výsledky, lze metodu považovat za selektivní [36].

Stresové testy pro prokázání selektivity HPLC metody se provádějí zátěží sledovaného analytu. Voleny jsou různé podmínky, například působení kyselého nebo alkalického prostředí, zvýšené teploty, oxidačního stresu, působení vody apod. Následně jsou hodnoceny degradační produkty a úplnost jejich separace od sledovaného analytu [36].

Je-li prokázáno, že HPLC metoda není dostatečně selektivní, lze selektivitu zvýšit změnou detekce (např. záměnou UV detekce za fluorescenční, elektrochemickou nebo MS) [36].

2.5.6 Robustnost metody

Robustnost metody je míra vlivu mírného kolísání hodnot jednotlivých parametrů metody na výsledek analytického stanovení. (Nováková, Douša, 2013, str.155)

Změněné podmínky mohou nastat například při mezilaboratorních zkouškách, pro tento případ se používá anglický ekvivalent ruggedness, nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (anglické robustness). Obecně jsou ale oba termíny považovány za synonyma [36].

Rozmezí proměnných faktorů by mělo být dostatečně široké, aby pokrylo standardní změny při laboratorních provedeních, ale zároveň ne příliš široké, neboť cílem není stanovení, při kterém metoda selže. Robustnost se obvykle testuje v pozdějších fázích vývoje metody, nebo při začátku validace. Při vývoji metody by měla být věnována pozornost chromatografickým parametrům, které jsou nejcitlivější vůči drobným změnám [38].

Faktory typicky měněné při testování robustnosti HPLC metody jsou složení, pH a průtok mobilní fáze, teplota, gradient a vlnová délka detektoru [38].

Pro měření a dokumentaci robustnosti HPLC metody by měly být zahrnuty parametry jako je retenční faktor t_r , tailing faktor T_f , kritické píkové rozlišení R_s , plocha píku a/nebo výška a koncentrace [38].

Při měření robustnosti metody lze využít jednorozměrné nebo vícerozměrné (multivariační) analýzy.

Jednorozměrná analýza zahrnuje změnu jen jednoho faktoru (proměnné) v čase (tzv OFAT, one factor at time). Ostatní proměnné zůstávají fixní a sleduje se ovlivnění výsledku. Následně je postup opakován s dalším parametrem. Přestože je časově náročný a zamezuje odhalení vzájemných interakcí jednotlivých faktorů, používá se tento přístup v laboratořích nejčastěji [36].

Multivariační (vícerozměrná) analýza ověřuje robustnost metody vůči změnám pomocí změn dvou a více proměnných. Faktory mohou být plynule měnitelné nebo binární. Analýza je časově velmi náročná a složitější pro naplánování a vyhodnocení, ale existují algoritmy, které ji usnadňují a je s úspěchem používána [36].

3 Experimentální část

Hlavní náplní této práce bylo určení validačních parametrů HPLC metody pro analýzu organických kyselin v ovocných 100% šťávách, konkrétně jablečné, pomerančové a grapefruitové. Cílem bylo zjistit:

- zda je metoda vhodná pro ověření těch parametrů autenticity ovocných 100% šťáv, které lze odhalit analýzou organických kyselin,
- zda je metoda opakovatelná, lineární v potřebném koncentračním rozsahu a jaké má detekční a kvantifikační limity, a zda tyto hodnoty odpovídají praktickému použití na vzorcích ovocných 100% šťáv.

Za tímto účelem byly analyzovány standardy šesti organických kyselin a kyseliny askorbové, a to jak jednotlivě, tak ve směsích. Dále byla provedena validace metody na vysokoučinné kapalinové chromatografii s reverzními fázemi a analýza reálných vzorků 100% ovocných šťáv z koncentrátů.

3.1 Přístroje

- kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260
- stolní počítač
- zařízení na přípravu demineralizované vody
- analytické váhy
- pH metr
- chladnička s mrazničkou
- ultrazvuková lázeň

Instrumentální analýza

- kolona: Kinetex Polar C18 (150 mm × 4.6 mm × 2.6 μm)
- průtok mobilní fáze: 0,6 ml/min
- složení mobilní fáze: 20 mMol KH₂PO₄, pH = 1,5
- teplota v termostatu: 40 °C
- detektor: DAD, 210 nm

3.2 Pomůcky

- mikropipety 10–100 μl, 100–1000 μl, špičky
- vialky 2 ml se šroubovacím uzávěrem a septem kaučuk-teflon
- běžné laboratorní sklo
- membránové filtry 0,45 μm
- plastové injekční stříkačky 5 ml

3.3 Chemikálie

- demineralizovaná voda
- kyselina citronová, 99,5 % (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- kyselina jablečná, 98 % (Sigma-Aldrich, Kanada)
- kyselina octová, 1000±4 mg/l (Fluka, Německo)
- kyselina mléčná, 1000±6 mg/l (Fluka, Německo)
- kyselina jantarová, min. 99,7 % (PENTA, Česká republika)
- kyselina askorbová, min. 99,7 % (Riedel-de-Haën, Rakousko)
- kyselina forsforečná, 85 % (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- dihydrogenfosforečnan draselný, 99,5–99,9 % (Sigma-Aldrich, Rakousko)
- acetonitril, 99,999 % (Sigma-Aldrich, Rakousko)

Popis použitých standardů

Pro tuto práci byly použity standardy šesti organických kyselin a kyseliny askorbové. Vybrané vlastnosti těchto standardů jsou shrnuty v následujících tabulkách. Validací parametry byly stanoveny pro kyselinu jablečnou, citronovou, jantarovou a askorbovou.

Tabulka 3.1: Vlastnosti kyseliny jablečné [12], [42].

Kyselina DL-jablečná	
Systematický název	kyselina hydroxybutandiová
Molekulová hmotnost	134,09 g·Mol ⁻¹
Hustota (20 °C)	1,609 g·cm ⁻³
pKa	3,40
Skupenství, vzhled	bílá krystalická látka
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě 558 g·l ⁻¹

Tabulka 3.2: Vlastnosti kyseliny jantarové [12], [42].

Kyselina jantarová	
Systematický název	kyselina butandiová
Molekulová hmotnost	118,09 g·Mol ⁻¹
Hustota (20 °C)	1,560 g·cm ⁻³
pKa	4,20
Skupenství, vzhled	bezbarvá krystalická látka
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě 58 g·l ⁻¹

Tabulka 3.3: Vlastnosti kyseliny citronové [12], [42].

Kyselina citronová	
Systematický název	kyselina 2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová
Molekulová hmotnost	192,13 g·Mol ⁻¹
Hustota (20 °C)	1,665 g·cm ⁻³
pKa	3,15
Skupenství, vzhled	bezbarvá krystalická látka
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě 1 330 g·l ⁻¹

Tabulka 3.4: Vlastnosti kyseliny mléčné [12], [42].

Kyselina mléčná	
Systematický název	kyselina 2-hydroxypropanová
Molekulová hmotnost	90,08 g·Mol ⁻¹
Hustota	1,206 g·cm ⁻³
pKa	3,86
Skupenství, vzhled	bezbarvá až nažloutlá kapalina
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě rozpustná

Tabulka 3.5: Vlastnosti kyseliny octové [12], [42].

Kyselina octová	
Systematický název	kyselina ethanová
Molekulová hmotnost	60,05 g·Mol ⁻¹
Hustota	1,049 g·cm ⁻³
pKa	4,76
Skupenství, vzhled	bezbarvá kapalina
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě neomezená

Tabulka 3.6: Vlastnosti kyseliny vinné [12], [42].

Kyselina vinná	
Název	2,3-hydroxybutandiová
Molekulová hmotnost	150,09 g·Mol ⁻¹
Hustota (20 °C)	1,760 g·cm ⁻³
pKa	2,89
Skupenství, vzhled	bílá krystalická látka
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě 1 390 g·l ⁻¹

Tabulka 3.7: Vlastnosti kyseliny askorbové [12], [42].

Kyselina askorbová	
Systematický název	2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lakton-2,3-endiol
Molekulová hmotnost	176,13 g·Mol ⁻¹
Hustota	1,65 g·cm ⁻³
pKa	4,10
Skupenství, vzhled	bezbarvá krystalická látka
Rozpustnost (20 °C)	ve vodě rozpustná

3.4 Popis analyzovaných vzorků

Pro analýzu reálných vzorků byly vybrány tyto ovocné šťávy (*obrázek 3.1*):

- 100% jablečná šťáva vyrobená z koncentrátu (Hermann Pfanner Getränke GmbH)
- 100% pomerančová šťáva vyrobená z koncentrátu (Hermann Pfanner Getränke GmbH)
- 100% grapefruitová šťáva vyrobená z koncentrátu šťávy růžového grapefruitu (Hermann Pfanner Getränke GmbH)



Obrázek 3.1: Vzorky ovocných šťáv.

Rakouský výrobce Pfanner byl vybrán na základě jeho stabilní nabídky 100% šťáv všech tří vybraných druhů. Šťávy z koncentrátů byly vybrány pro svoji dobrou cenovou dostupnost a v podstatě stálou nabídku.

3.5 Pracovní postupy

Příprava mobilní fáze

Navážka 1,3609 g dihydrogenfosforečnanu draselného byla kvantitativně převedena do 500ml odměrné baňky a rozpuštěna v deionizované vodě. Přídavkem 9,8 ml kyseliny fosforečné bylo pH roztoku upraveno na potřebnou hodnotu 1,5 a baňka byla doplněna po rysku. Poté byla hodnota pH opět ověřena a baňka byla na 2 minuty umístěna do ultrazvukové lázně.

Příprava standardních roztoků

Všechny standardy byly v pevném skupenství. Byly připraveny roztoky o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ pro následné ředění roztoků do kalibračních řad, měření opakovatelnosti atd. Navážka 0,0250 g byla kvantitativně převedena do 25ml odměrné baňky a doplněna deionizovanou vodou po rysku. Baňky byly na 2 minuty umístěny do ultrazvukové lázně.

Pracovní postup při stanovení opakovatelnosti

Pro stanovení opakovatelnosti metody byly použity standardy kyseliny citronové, jablečné, jantarové a askorbové. Z těchto standardů byly připraveny roztoky v koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a proměřeny v šesti opakovaných nástřících z téže vialky. Byl vypočten aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Pracovní postup při stanovení linearit

Pro stanovení linearit byly připraveny roztoky standardů v šesti koncentračních hladinách. Z roztoků každého ze standardů o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ byly připraveny roztoky o koncentraci 25, 50, 100, 200, 400 a $600 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Všechny roztoky byly podrobeny HPLC analýze. Byly vyhodnoceny plochy píků jednotlivých standardů a koncentračních hladin a následně byla pro každou kyselinu vynesena závislost plochy píku na koncentraci.

Pracovní postup při stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti proběhlo pomocí postupného ředění vzorků standardů a jejich analýzy na kapalinovém chromatografu. Z roztoku každého standardu o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ byly připraveny roztoky o koncentraci 25, 50, 100, 200, 400 a $600 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, které byly podrobeny HPLC analýze. Pro každý analyt byla sestrojena závislost výšky píku na koncentraci. Z chromatogramů bylo určeno maximální kolísání základní linie h_{max} v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu a na základě výpočtů podle vztahů 3.2, 3.3, 3.4 a 3.5 byly stanoveny meze detekce a stanovitelnosti.

Příprava vzorků ovocných šťáv

Jednotlivé ovocné šťávy byly 100x zředěny a přefiltrovány přes $0,45 \mu\text{m}$ filtr. 1 ml každého takto připraveného vzorku byl napipetován do vialky o objemu 2 ml a umístěn do autosampleru kapalinového chromatografu. Vzorky ovocných šťáv byly podrobeny HPLC analýze a na základě retenčních časů byly identifikovány některé píky.

3.6 Validované parametry analytické metody

3.6.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Měla by být určena buď z devíti vzorků (tři koncentrační hladiny, tři opakování), nebo z šesti vzorků cílové koncentrace [36], [43].

3.6.2 Linearita metody

Linearita definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné ke koncentraci analytu. Těsnost této vzájemné závislosti je charakterizována korelačním koeficientem [43], [53].

Vyjádření lineární regrese:

$$y = a + b \cdot x \quad (3.1)$$

3.6.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce určuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, která může být detekována, ale ne nutně kvantifikována [36].

Odezva meze detekce:

$$y_D = 3 \cdot h_{max} \quad (3.2)$$

Koncentrace meze detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1} \quad (3.3)$$

Mez stanovitelnosti určuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze za podmínek metody kvantifikovat s přijatelnou přesností [36].

Odezva meze stanovitelnosti:

$$y_Q = 10 \cdot h_{max} \quad (3.4)$$

Koncentrace meze stanovitelnosti:

$$x_Q = \frac{y_Q}{b_1} \quad (3.5)$$

3.7 Vyhodnocení výsledků HPLC analýzy

Pro vyhodnocení výsledků byl použit program *Agilent OpenLAB Data Analysis*, pomocí kterého byly zjištěny retenční časy, plochy a výšky pík analytů ve standardech a vzorcích. Na základě těchto údajů byly poté za pomoci programu *Microsoft Office Excel 2016* provedeny potřebné výpočty. Pro určení validačních parametrů byly také vyneseny závislosti plochy nebo výšky pík standardů na koncentraci.

3.7.1 Statistické zpracování naměřených dat

Pro statistické vyhodnocení naměřených dat byl použit program *Microsoft Office Excel 2016* a byly určeny hodnoty parametrů jako je aritmetický průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech hodnot vydělených jejich počtem. Obvykle je značen vodorovným pruhem nad názvem proměnné [43]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.6)$$

Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka popisuje míru přesnosti série paralelních výsledků. Charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot kolem aritmetického průměru [43]:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.7)$$

Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru [43]:

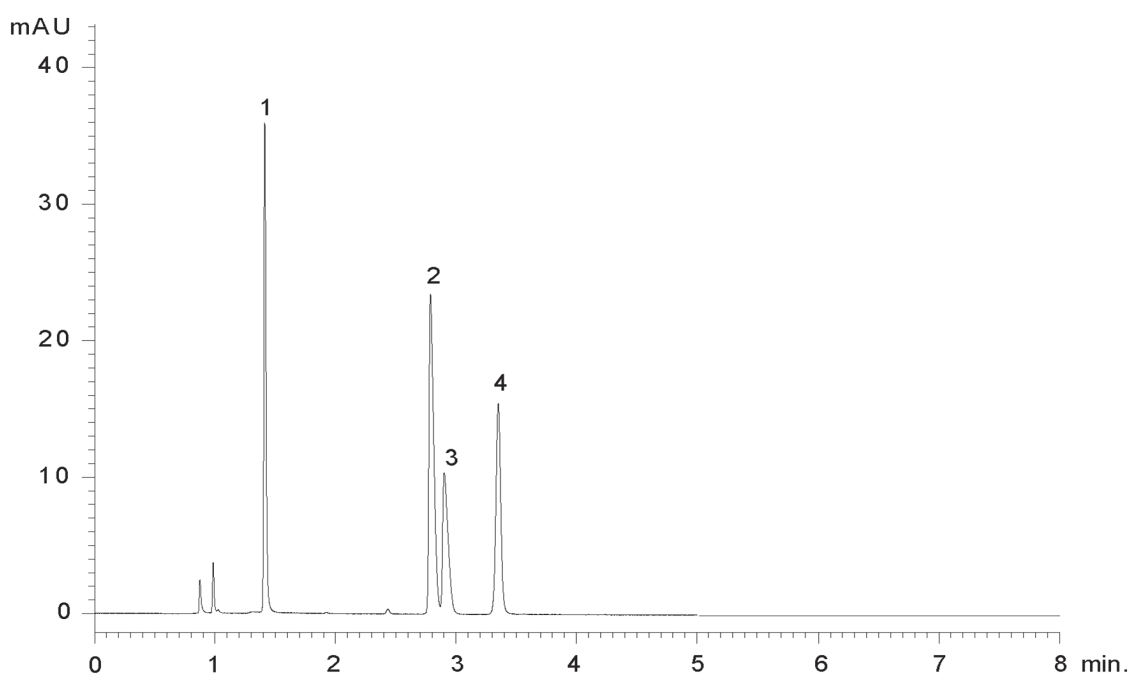
$$s_r = \frac{s}{x} \cdot 100[\%] \quad (3.8)$$

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace podmínek HPLC metody

Pro analýzu byl zvolen HPLC systém s reverzními fázemi. Takto lze separovat organické kyseliny za použití vodných mobilních fází, případně jen s malým přídatkem organického rozpouštědla. Oproti výhodám, které skýtá použití vodné mobilní fáze, má tato analýza také nevýhody, jako například nutnost úpravy pH mobilní fáze nebo nízké hodnoty retenčních časů. V následujících kapitolách jsou uvedeny parametry, které byly pro analýzu vyzkoušeny, a na jejichž základě byla metoda optimalizována.

Jako vzor pro tuto práci byl vybrán aplikační list poskytovaný výrobcem kolon [45] a podmínky v něm uvedené. Vzorový chromatogram organických kyselin z aplikačního listu je na *obrázku 4.1*.



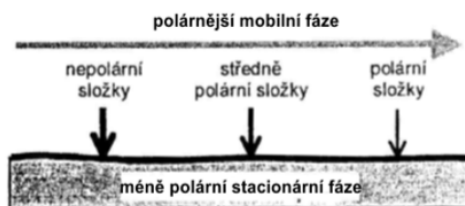
Obrázek 4.1: Ukázkový chromatogram. 1–kyselina jablečná, 2–kyselina citronová, 3–kyselina fumarová, 4–kyselina jantarová [45].

4.1.1 Výběr kolony

Byla zvolena kolona Kinetex Polar C18 (150 mm × 4.6 mm × 2.6 μm). Jedná se o kolonu s chemicky vázanou stacionární fází, která je vhodná pro separaci polárních analytů za vhodného pH mobilní fáze. V systému reverzních fází jsou nejméně zadržovány polární složky; méně polární složky jsou separovány s vyšší retencí (*obrázek 4.2*). Kolona je stabilní ve vodném prostředí a v prostředí o pH 1,5–8,5 [45].

4.1.2 Složení mobilní fáze

Mobilní fáze má na separaci zásadní vliv. Vytváří podmínky, v nichž je analyt schopen potřebné interakce s řetězci stacionární fáze. Pro organické kyseliny jakožto polární látky platí, že jsou na nepolární stacionární fázi zadržovány velmi málo nebo vůbec ne. V alkalickém prostředí je retence výrazně potlačena kvůli disociaci kyselin. Je proto nutné, aby se nacházely v prostředí o pH alespoň 1 nebo 2 jednotky pH pod hodnotou jejich pKa. Hodnota pH mobilní fáze je jednou z hlavních možností ovlivnění retenčních faktorů separovaných látek při analýze [52], [35].



Obrázek 4.2: Separace na RP-HPLC [40].

20mMol fosforečnan draselný, pH 1,5

Vzorová analýza podle aplikačního listu kolony probíhala s mobilní fází připravenou z 20mMol roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a úpravou pH pomocí kyseliny fosforečné.

Další mobilní fáze

Byly zkoušeny analýzy s jiným složením mobilní fáze, avšak nebylo dosaženo lepší separace látek. Všechny analyty byly eluovány v kratších retenčních časech a s horším rozlišením. Zkoušené mobilní fáze byly:

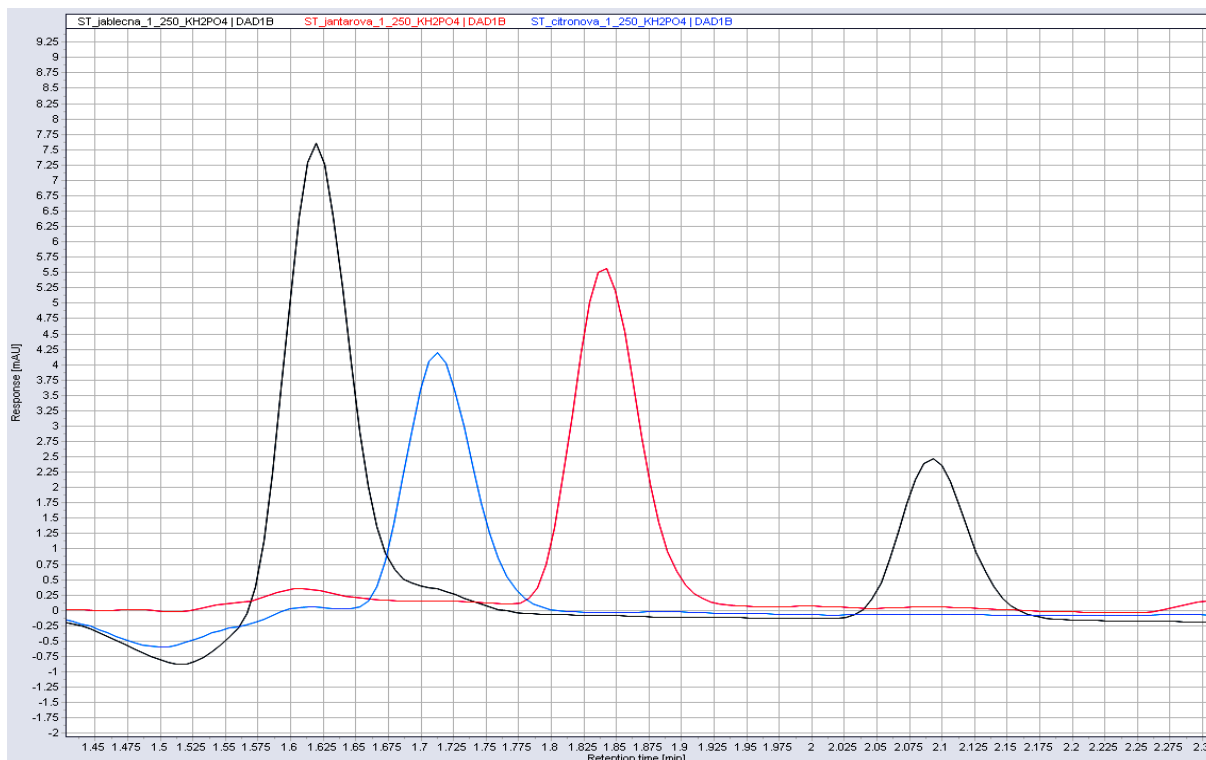
- 5mMol H_3PO_4 + 1 % ACN
- 10mMol H_3PO_4 + 1 % ACN
- 5mMol H_2SO_4 + 1 % ACN

4.1.3 Volba elučního módu

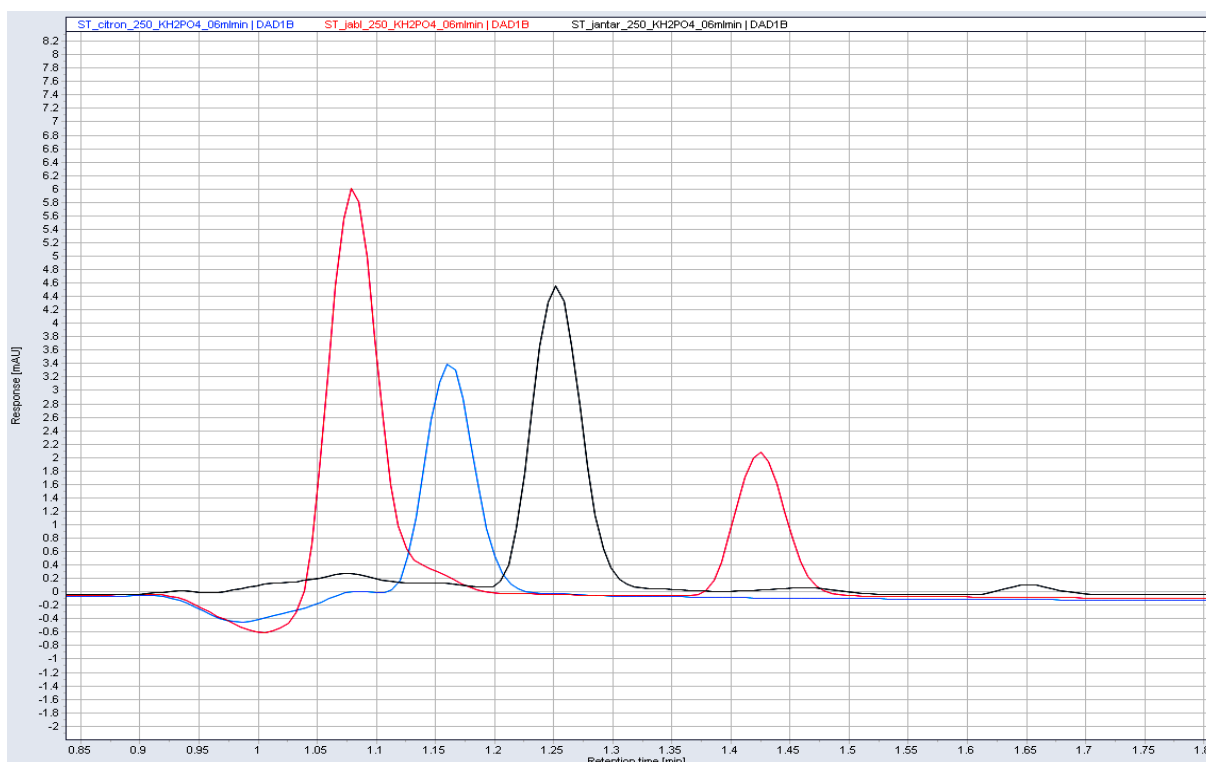
Kvůli podobnosti všech látek analyzovaných v této práci byla zvolena izokratická eluce, tedy analýza s konstantním složením mobilní fáze.

4.1.4 Průtok mobilní fáze

Byly zkoušeny analýzy za dvou různých průtoků, a to $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Vyšší průtok nebylo možné nastavit z důvodu vysokého tlaku na koloně. Analýza při průtoku $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ probíhala při tlaku 370 bar. Analýzy při nižším průtoku vykazovaly širší píky a horší rozlišení. Ukázky chromatogramů s oběma zkoušenými průtoky jsou na *obrázku 4.3 a 4.4*.



Obrázek 4.3: Průtok mobilní fáze 4 ml·min⁻¹.



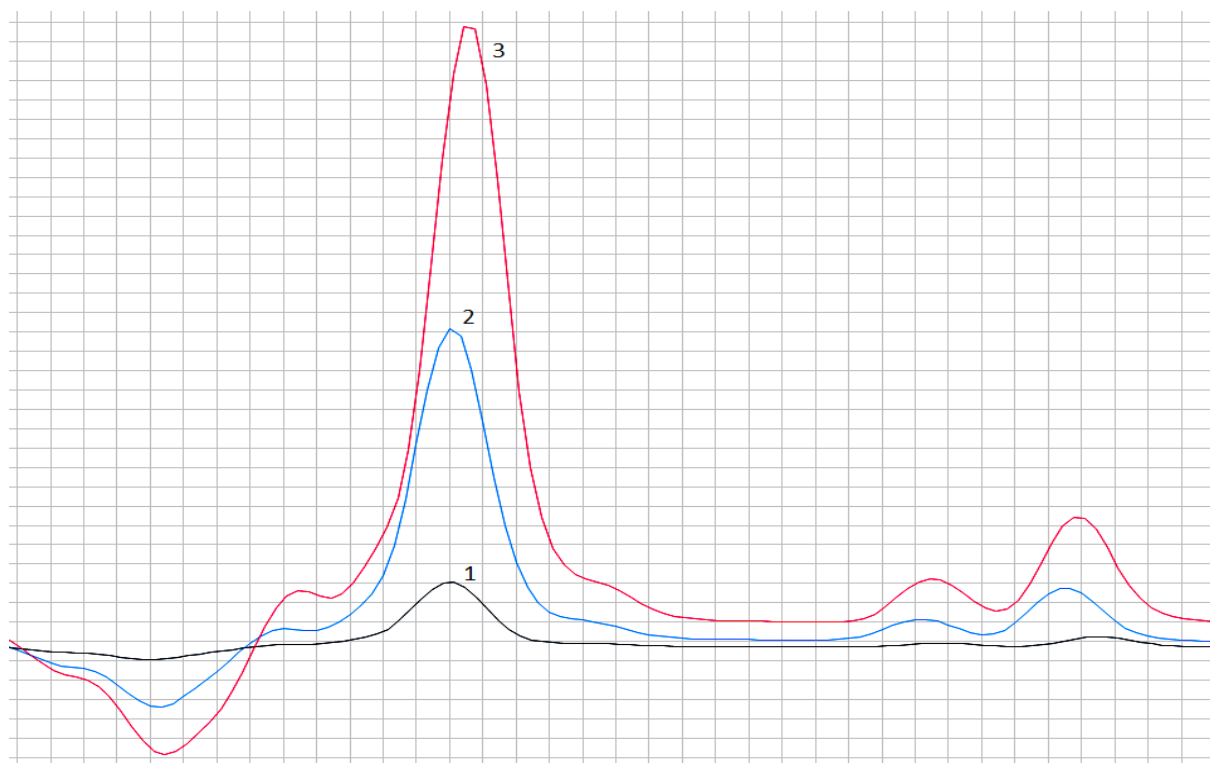
Obrázek 4.4: Průtok mobilní fáze 6 ml·min⁻¹.

4.1.5 Teplota kolony

V aplikačním listu [45] je uvedena teplota na koloně jako okolní, tedy 20–25 °C. Vzhledem k vysokému průtoku mobilní fáze, který je v tomto zdroji uveden ($1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), byla zvolena alternativa zvýšené teploty s cílem snížení tlaku a možnosti zvýšení průtoku. Podle další literatury (například [55]) není separace organických kyselin při teplotách vyšších než laboratorních narušena. Teplota analýzy byla postupně zvýšena až na 40 °C.

4.1.6 Objem nástřiku vzorku

Byly provedeny nástřiky o objemu $1 \mu\text{l}$, $5 \mu\text{l}$ a $10 \mu\text{l}$. Chromatogram na *obrázku 4.5* ukazuje různé objemy nástřiku standardu kyseliny citronové o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Při nástřiku $1 \mu\text{l}$ byly píky standardů nejužší, tento nástřik byl proto zvolen pro další analýzy.

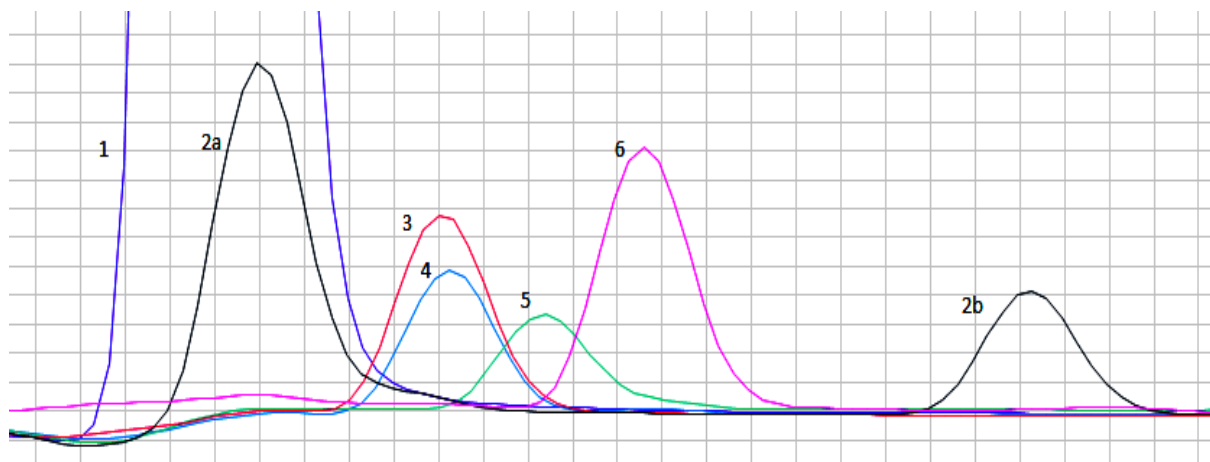


Obrázek 4.5: Srovnání různých objemů nástřiku vzorku na kolonu: 1– $1 \mu\text{l}$, 2– $5 \mu\text{l}$, 3– $10 \mu\text{l}$.

4.2 Validace HPLC metody

Nejprve byly analyzovány všechny standardy, které jsou popsány v *kapitole 3.3*, tedy 6 organických kyselin a kyselina askorbová. Kyselina askorbová byla do seznamu standardů přidána pro její významný obsah v ovocných šťávách a retenční charakteristiky blízké organickým kyselinám. Proložené a přibližné píky standardů jsou na *obrázku 4.6*. Z tohoto proložení a z analýz směsných standardů plyne, že metodou za stávajících podmínek nelze separovat všechny uvedené látky, neboť nebylo dosaženo dostatečného rozlišení a některé z nich mají velmi podobné retenční časy. Proto z nich byly vybrány čtyři, kterými se

bude experimentální práce dále zabývat. Těmi jsou kyselina jablečná, kyselina citronová, kyselina jantarová a kyselina askorbová. Pro praktické využití v analýze ovocných 100% šťáv je takové omezení problémem jen částečným, protože ne vždy se v ovoci vyskytují všechny kyseliny ve významných množstvích. Může ale dojít k adici, která zkreslí výsledky. Bylo by vhodné metodu dále optimalizovat pro rozdělení všech kyselin, které se v daném ovoci mohou vyskytovat. Případně by bylo vhodné metodu kombinovat s jinými metodami, například elektromigračními či enzymatickými.



Obrázek 4.6: Proložené píky standardů: 1 – kyselina askorbová, 2a – kyselina L-jablečná, 2b – kyselina D-jablečná, 3 – kyselina citronová, 4 – kyselina mléčná, 5 – kyselina octová, 6 – kyselina jantarová.

Validační parametry byly stanoveny u čtyř standardů, které byly podrobeny HPLC analýze samostatně i ve směsích. Stanovena byla opakovatelnost, linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti podle postupů uvedených v kapitole 3.5. Použity byly standardy kyseliny citronové, jablečné, jantarové a askorbové, které jsou podrobněji popsány v kapitole 3.3.

4.2.1 Opakovatelnost metody

Pro stanovení opakovatelnosti byla zvolena metoda šesti opakovaných měření vzorků stejné koncentrační hladiny (postup uveden v kapitole 3.5). Standardy o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ byly měřeny postupně v šesti po sobě následujících nástricích. Plochy píků a retenční časy každého standardu byly následně srovnány a za použití vztahů 3.6, 3.7 a 3.8 byla vypočtena relativní směrodatná odchylka RSD [%]. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 4.1 a 4.2.

Hodnota relativní směrodatné odchylky by neměla přesáhnout 10 % [44]. Všechny analyzované látky tuto podmínku splňují. Relativní směrodatná odchylka pro opakovatelnost podle retenčních časů byla u analyzovaných látek v rozsahu 0–0,109 %, pro opakovatelnost podle ploch píků v rozsahu 0,256–1,046 %. Nejnižší hodnoty RSD náleží v obou případech kyselině askorbové, nejvyšší kyselině D-jablečné a kyselině jantarové.

Metoda je pro kyselinu jablečnou, citronovou, jantarovou a askorbovou dostatečně přesná a lze ji použít pro opakovatelná stanovení těchto látek v ovocných šťávách.

Tabulka 4.1: Opakovatelnost metody podle retenčních časů t_r [min].

Kyselina	Opakování						\bar{x}	SD	RSD
	1	2	3	4	5	6	[min]	[min]	[%]
L-jablečná	1,093	1,093	1,094	1,094	1,093	1,093	1,093	0,000 5	0,047
D-jablečná	1,468	1,468	1,468	1,467	1,465	1,468	1,467	0,001 2	0,082
jantarová	1,463	1,461	1,462	1,465	1,463	1,465	1,463	0,001 6	0,109
citronová	1,183	1,183	1,183	1,183	1,182	1,182	1,183	0,000 5	0,043
askorbová	1,013	1,013	1,013	1,013	1,013	1,013	1,013	0	0

Tabulka 4.2: Opakovatelnost metody podle ploch píků A [mAU·min].

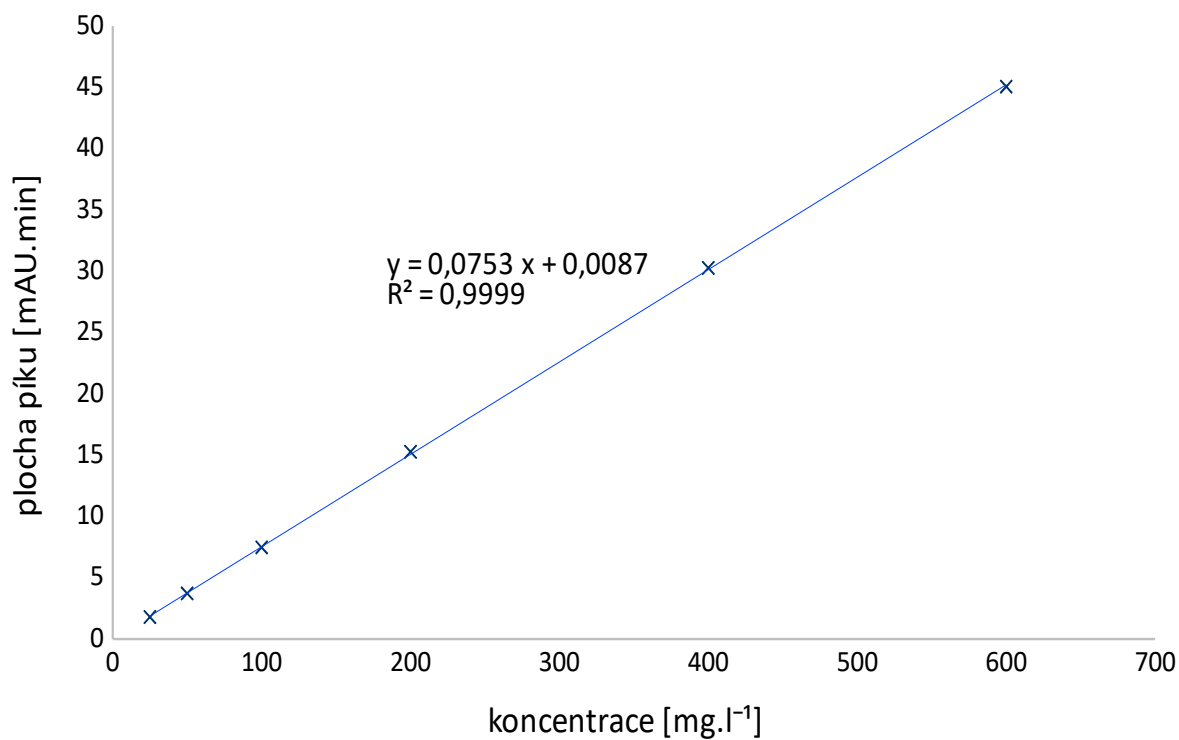
Kyselina	Opakování						\bar{x}	SD	RSD
	1	2	3	4	5	6	[mAU·min]	[mAU·min]	[%]
L-jablečná	5,856	5,856	5,855	5,916	5,893	5,919	5,887 8	0,030 7	0,522
D-jablečná	1,253	1,253	1,240	1,254	1,228	1,226	1,240 2	0,013 0	1,046
jantarová	34,831	34,545	34,392	34,089	33,936	33,974	34,187 2	0,356 0	1,041
citronová	8,441	8,496	8,444	8,452	8,434	8,379	8,441 0	0,037 5	0,445
askorbová	16,512	16,502	16,521	16,541	16,542	16,620	16,545 2	0,042 4	0,256

4.2.2 Linearita metody

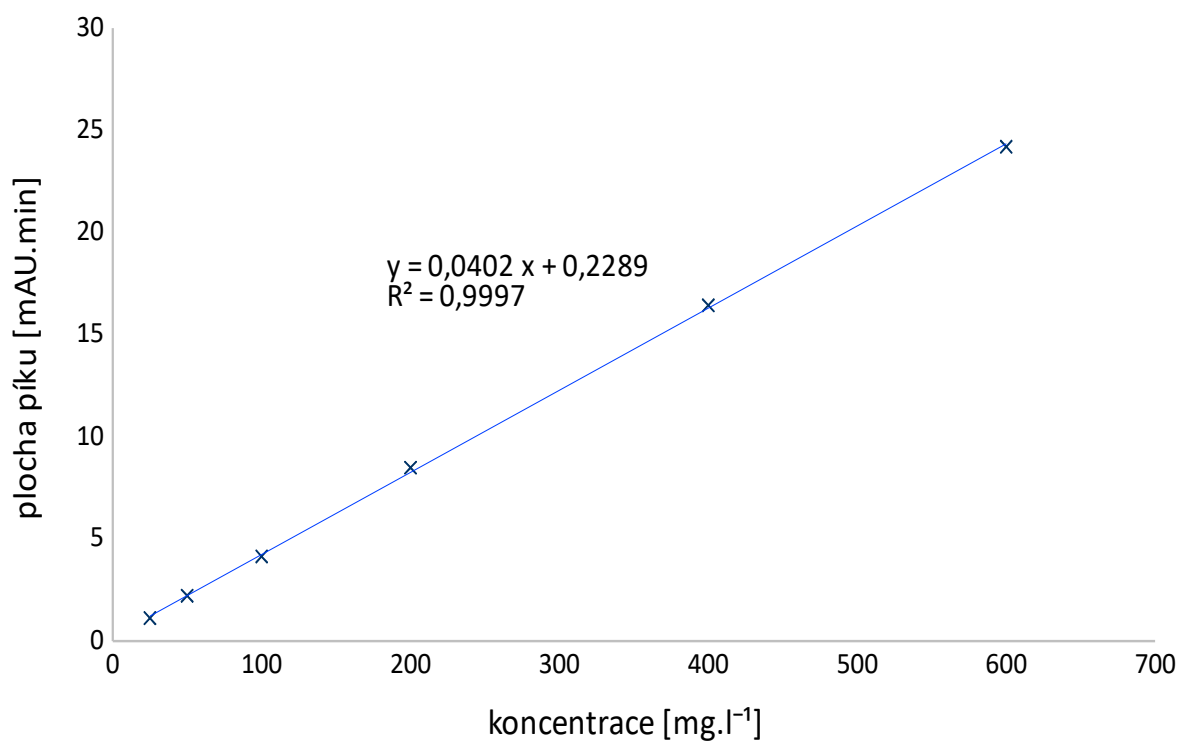
Linearita byla stanovena pomocí analýzy šesti koncentračních hladin čtyř vybraných standardů – kyseliny jablečné, jantarové, citronové a askorbové (postup uveden v kapitole 3.5). Analyzované koncentrační hladiny a plochy píků jsou uvedeny v tabulce 4.3. Byly sestaveny kalibrační přímky závislosti plochy píku na koncentraci, které jsou na obrázcích 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 a 4.5, a pomocí nichž byly získány hodnoty korelačních koeficientů pro jednotlivé analyty. Korelační koeficienty R^2 jsou shrnuty v tabulce 4.4.

Tabulka 4.3: Koncentrace a plochy píků jednotlivých standardů.

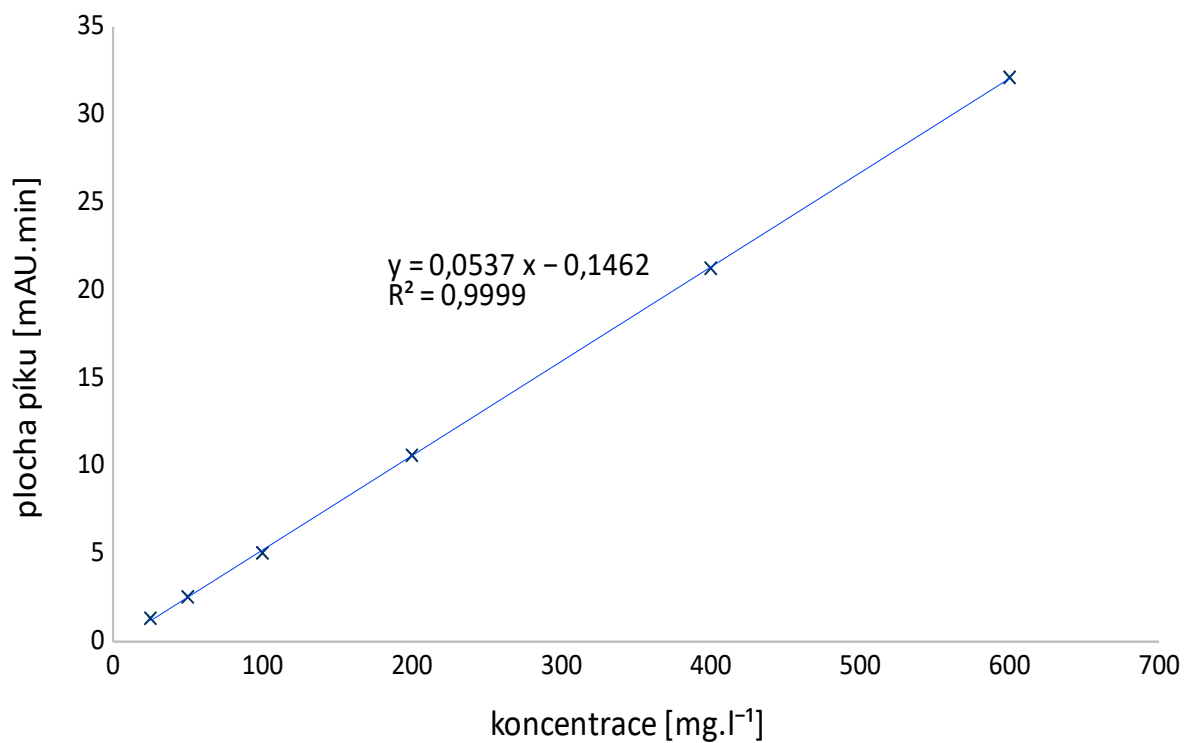
c [mg·l ⁻¹]	Plochy píků jednotlivých kyselin A [mAU·s]				
	L-jablečná	D-jablečná	jantarová	citronová	askorbová
25	1,804	1,128	1,337	2,103	21,931
50	3,725	2,227	2,550	3,544	40,931
100	7,485	4,148	5,054	9,450	90,371
200	15,272	8,491	10,611	16,453	193,137
400	30,285	16,440	21,260	37,278	399,334
600	45,067	24,199	32,117	54,905	591,417



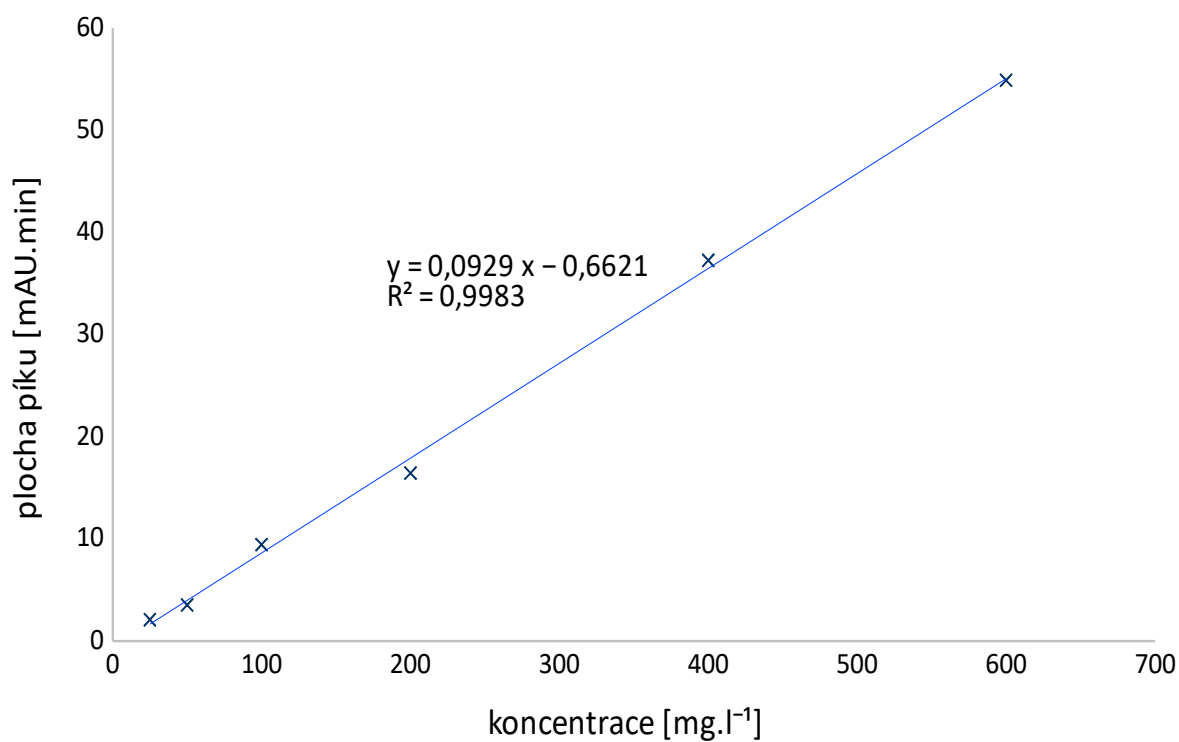
Graf 4.1: Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny L-jablečné.



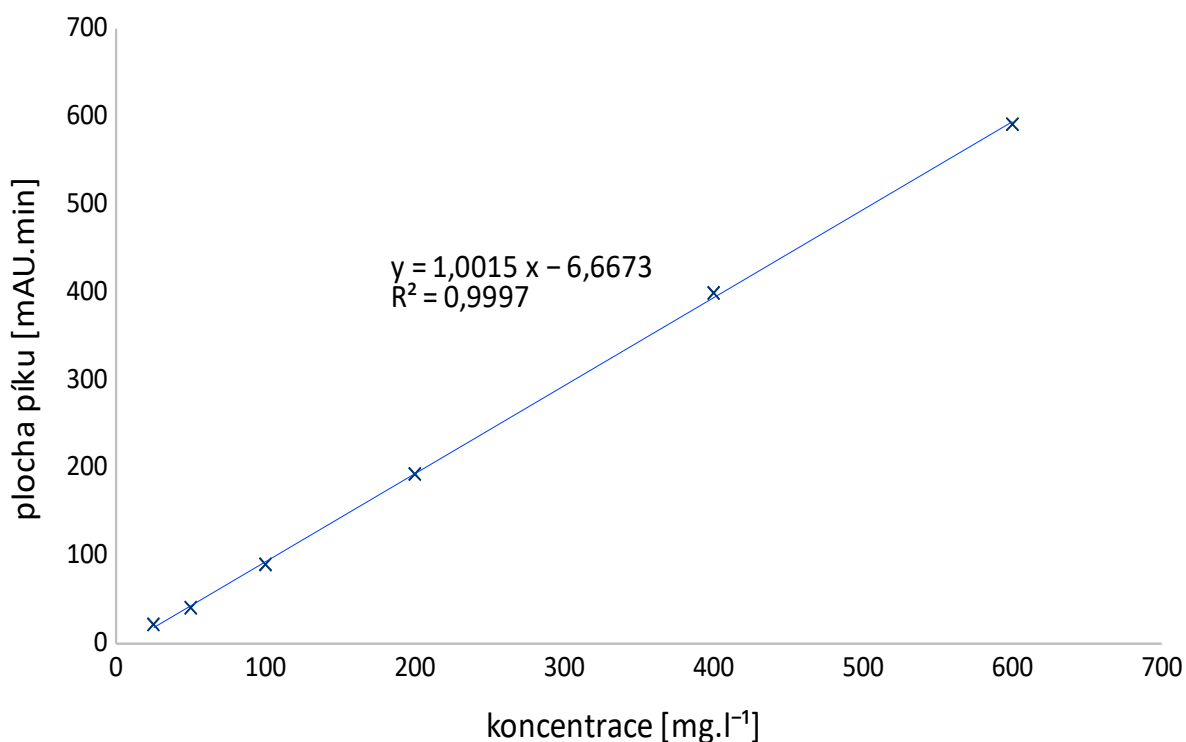
Graf 4.2: Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny D-jablečné.



Graf 4.3: Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jantarové.



Graf 4.4: Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové.



Graf 4.5: Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny askorbové.

Tabulka 4.4: Hodnoty korelačních koeficientů R^2 .

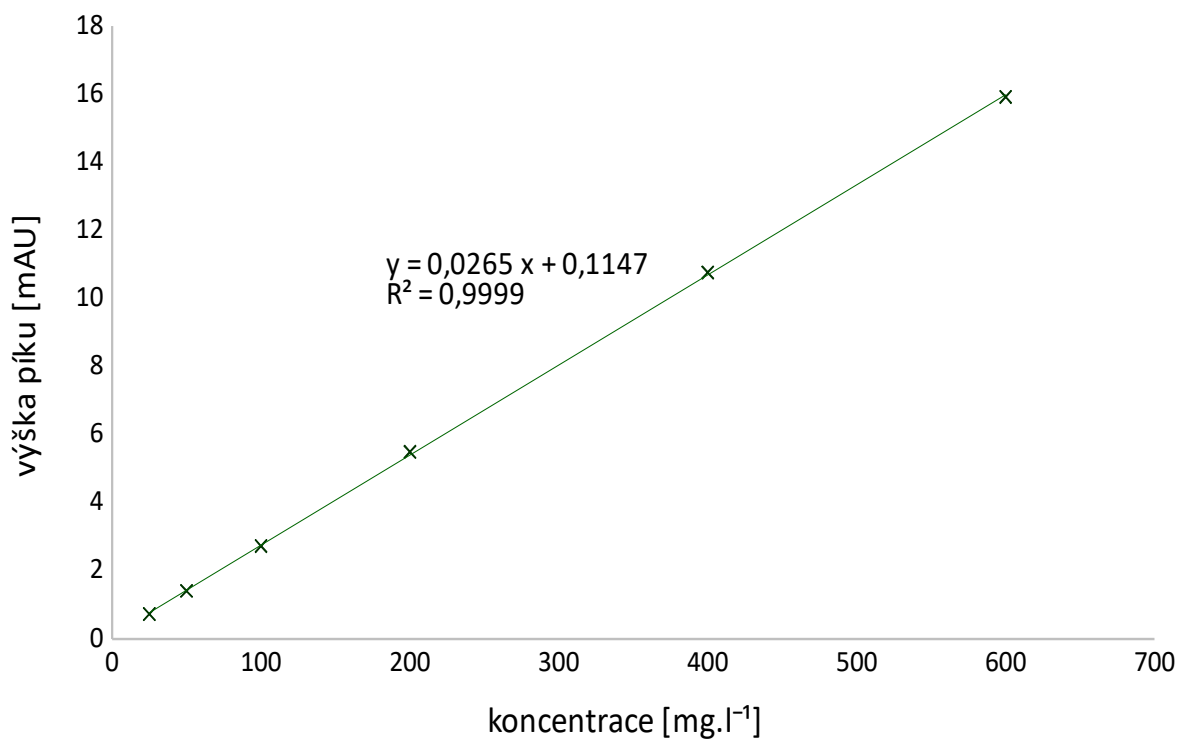
Kyselina	L-jablečná	D-jablečná	jantarová	citronová	askorbová
R^2	0,9999	0,9997	0,9999	0,9983	0,9997

Hodnoty korelačních koeficientů by neměly klesnout pod hodnotu 0,98 [44]. Z *tabulky 4.4* je zřejmé, že analyzované kalibrační řady tuto podmínku splňují. Vysoké hodnoty korelačních koeficientů potvrzují linearitu metody v celém měřeném koncentračním rozsahu, tedy mezi 25 a 600 mg.l⁻¹.

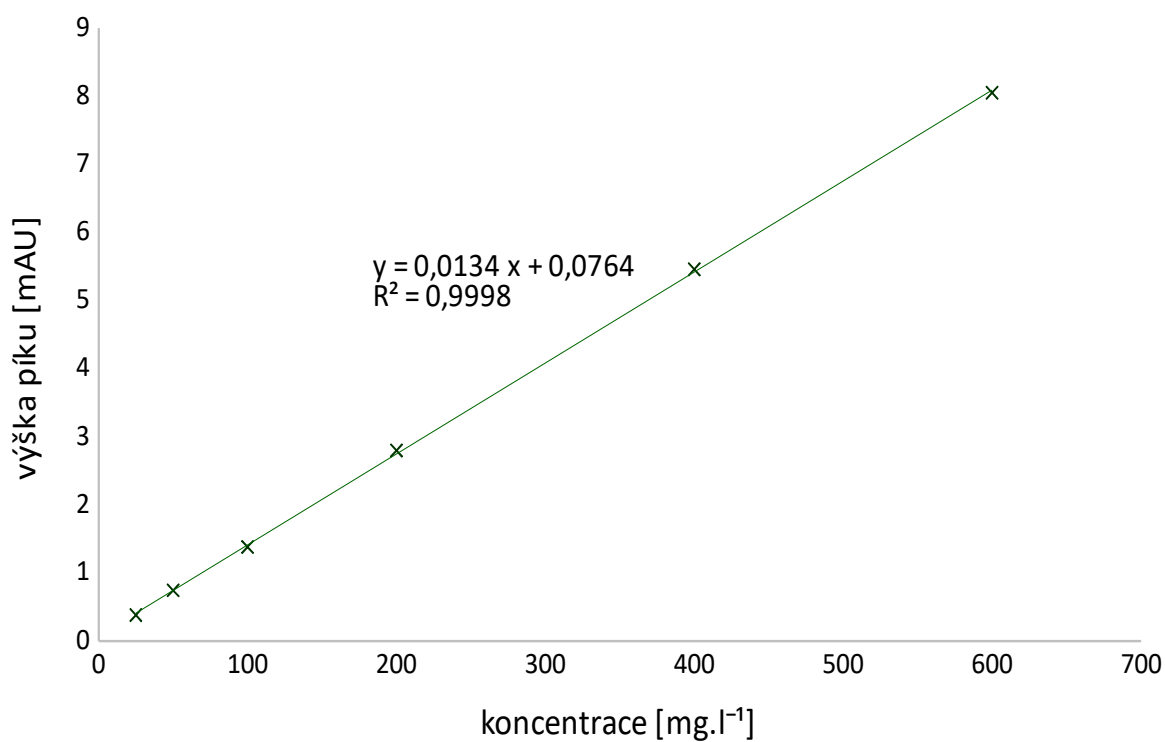
V ovocných šťávách lze očekávat některé organické kyseliny ve vyšších koncentracích. Jednat se může například o kyselinu jablečnou v jablečné šťávě, o kyselinu citronovou v citrusových šťávách či o kyselinu askorbovou. Vzhledem k ředění vzorku ovocné šťávy před analýzou tyto kyseliny také spadají do validovaného lineárního rozsahu metody.

4.2.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

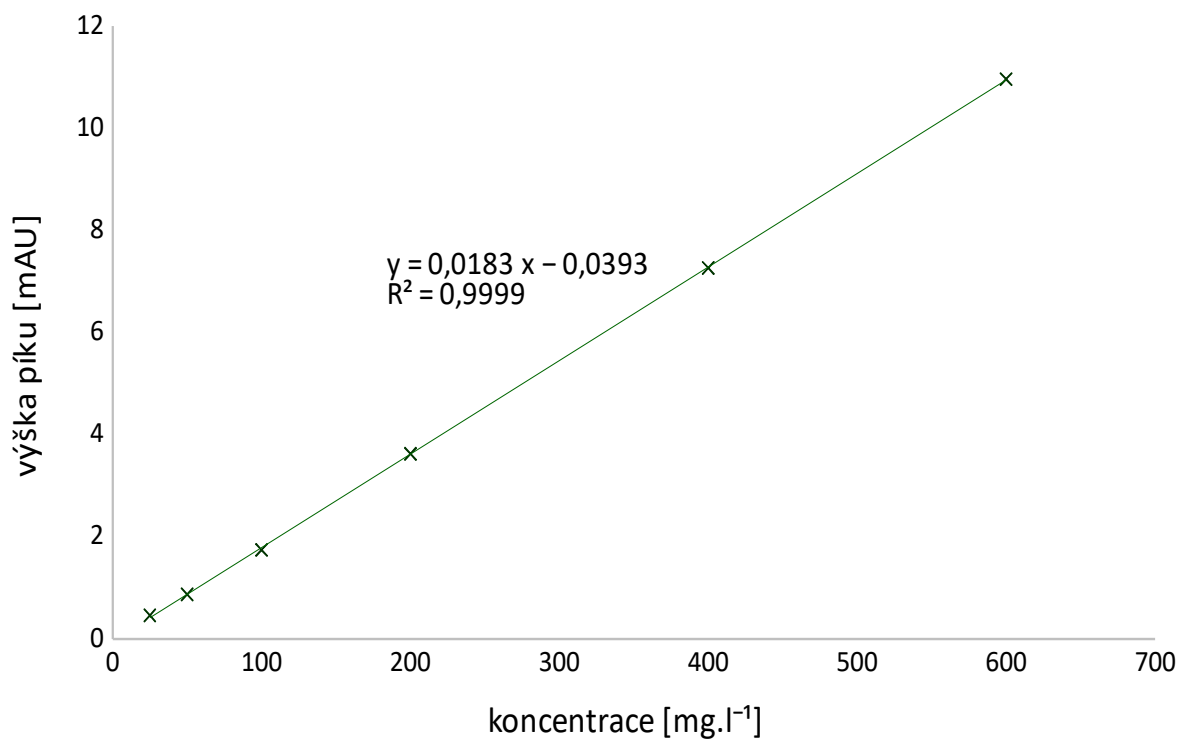
Pro výpočet LOD a LOQ bylo určeno maximální kolísání základní linie h_{max} v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Dále byla vynesena závislost výšky chromatografického píku na koncentraci jednotlivých validovaných sloučenin. Na základě těchto hodnot byly stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti pro kyselinu L-jablečnou, D-jablečnou, citronovou, jantarovou a askorbovou. Pracovní postup stanovení je popsán v *kapitole 3.5*. Pro výpočet LOD byly použity *vztahy 3.2 a 3.3*, pro výpočet LOQ *vztahy 3.4 a 3.5*. Výsledky jsou uvedeny v *tabulce 4.5*.



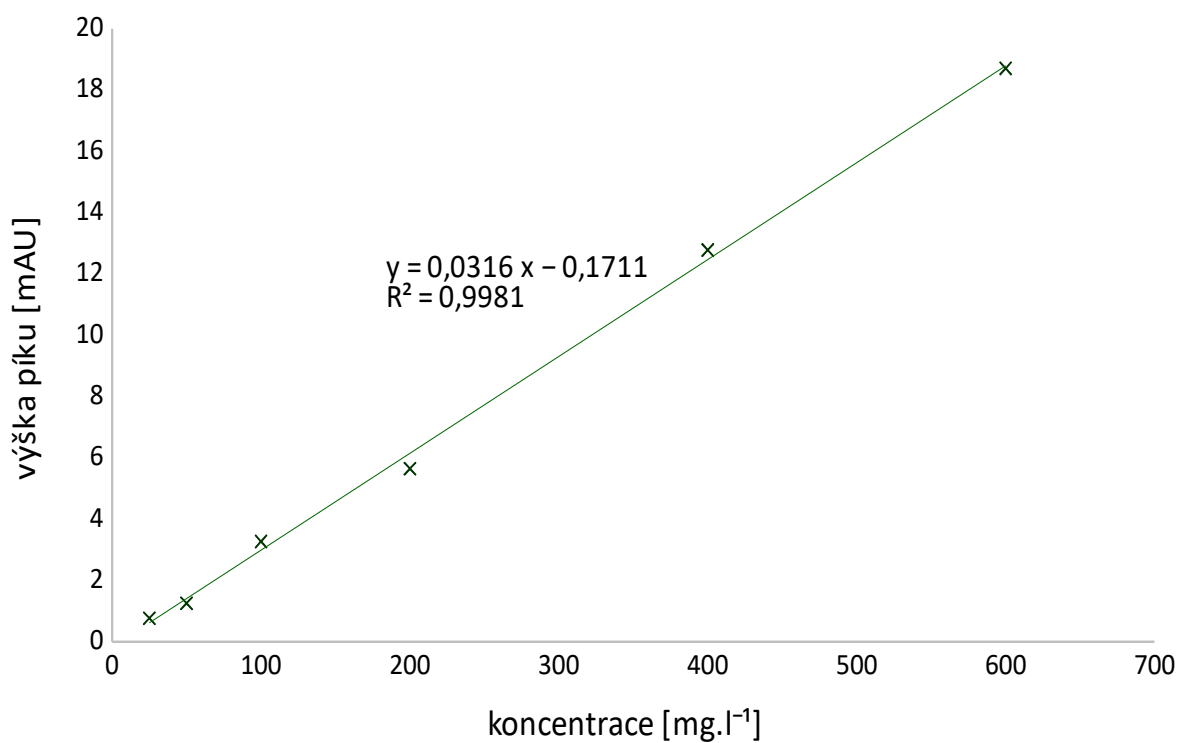
Graf 4.6: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny L-jablečné.



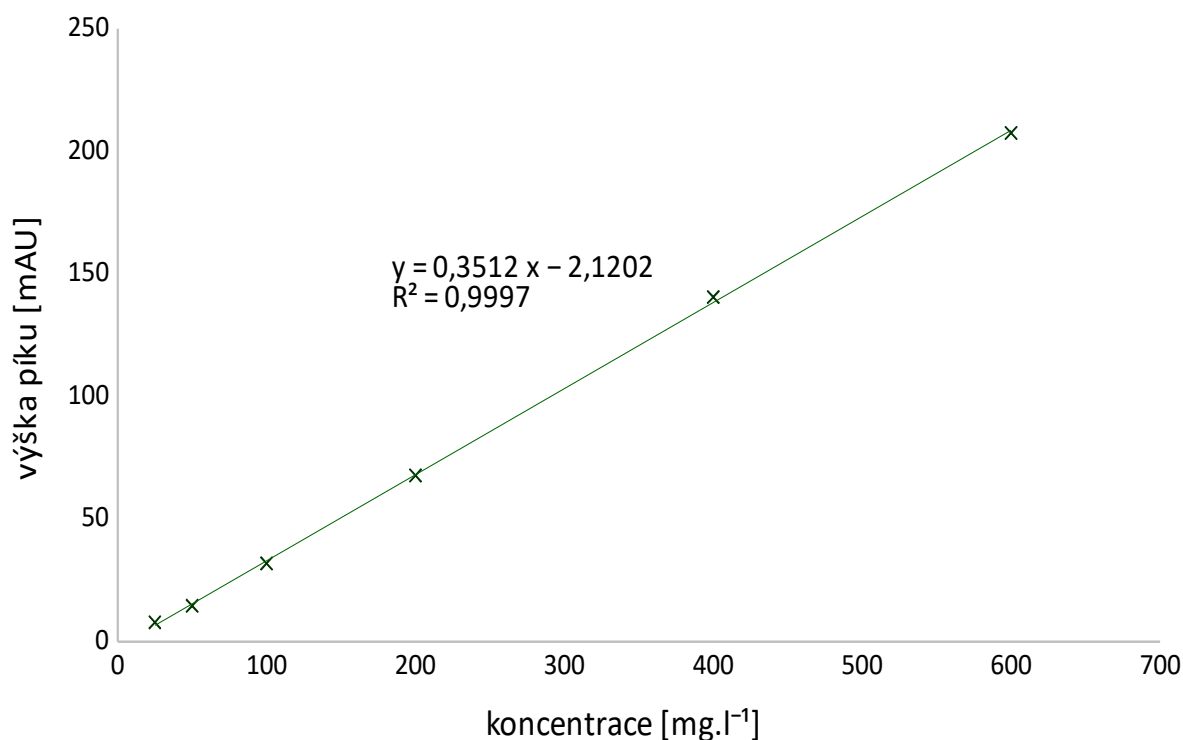
Graf 4.7: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny D-jablečné.



Graf 4.8: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny jantarové.



Graf 4.9: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny citronové.



Graf 4.10: Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny askorbové.

Tabulka 4.5: Mez detekce, mez stanovitelnosti.

Kyselina	h_{max}	b_1 [mAU]	y_D [mAU]	y_Q [mAU]	x_D [mg.l ⁻¹]	x_Q [mg.l ⁻¹]
L-jablečná	0,026	0,026 5	0,078	0,260	2,94	9,81
D-jablečná	0,019	0,013 4	0,057	0,190	4,25	14,18
jantarová	0,029	0,031 6	0,087	0,290	2,75	9,18
citronová	0,023	0,018 3	0,069	0,230	3,77	12,57
askorbová	0,022	0,351 2	0,066	0,220	0,19	0,63

h_{max} ...maximální kolísání základní linie

y_D ...odezva meze detekce

y_Q ...odezva meze stanovitelnosti

b_1 ...směrnice kalibrační přímky (závislost výšky píku na koncentraci standardu)

x_D ...LOD - koncentrace na mezi detekce

x_Q ...LOQ - koncentrace na mezi stanovitelnosti

LOD a LOQ pro jablečné šťávy

Při ověřování pravosti jablečných šťáv je jedním ze zásadních parametrů nulový obsah kyseliny D-jablečné, jejíž přítomnost vyvolává podezření na přídavek synteticky připravené kyseliny jablečné, která má zastoupení obou forem. Přírodní šťáva obsahuje pouze kyselinu L-jablečnou. Norma [47] stanoví minimální hodnotu kyseliny L-jablečné pro jablečné 100% šťávy na 3,0 g.l⁻¹. Poměr L a D forem kyseliny jablečné byl na základě srovnání ploch píků

při měření kalibrační řady stanoven na $L : D = 4,7 : 1$. Za extrémního předpokladu, že by všechna tato kyselina L-jablečná byla synteticky připravena, vyskytovalo by se v jablečné šťávě zjištěnému poměru odpovídající množství kyseliny D-jablečné, a to $642,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce kyseliny D-jablečné byl touto metodou stanoven na $5,60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Takové množství odpovídá $26,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny L-jablečné, tedy celkovému přídávku kyseliny jablečné o hmotnosti $31,8 \text{ mg}$ na jeden litr jablečné šťávy. Takový přírůstek je tedy již možno touto metodou detekovat.

Minimální koncentraci kyseliny L-jablečné, kterou určuje norma [47] pro jablečné 100% šťávy, tedy $3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, lze pomocí této metody úspěšně detekovat a kvantifikovat.

Kyselina citronová se má podle normy [47] vyskytovat v koncentraci $50\text{--}200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Limit detekce byl stanoven na $2,37 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, touto metodou lze tedy obsah kyseliny citronové v jablečných šťávách úspěšně jak detekovat, tak kvantifikovat.

LOD a LOQ pro pomerančové šťávy

Normou stanovený rozsah obsahu kyseliny citronové v pomerančových 100% šťávách je $6,3\text{--}17,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ [48]. Kyselinu citronovou lze tedy detekovat i kvantifikovat s dostatečnou přesností.

Normovaný obsah kyseliny L-jablečné je $0,8\text{--}3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ [48]. Jedná se o koncentraci detekovatelnou i kvantifikovatelnou s dostatečnou přesností. Obdobně jako výše u šťáv jablečných lze usuzovat, že by se použitou metodou detekoval již celkový přírůstek syntetické kyseliny jablečné v množství $8,5 \text{ mg}$ na jeden litr pomerančové šťávy.

LOD a LOQ pro grapefruitové šťávy

Pro analýzu grapefruitových šťáv platí stejné závěry jako u šťáv pomerančových, jen s drobnými rozdíly v normovaných hodnotách. Ty lze vyhledat v *tabulkách 5.2 a 5.3*. Normou udávané hodnoty pro kyselinu citronovou i L-jablečnou jsou metodou detekovatelné i kvantifikovatelné [49].

Všechny validované parametry jsou shrnuty v *tabulce 4.6*.

Tabulka 4.6: Výsledky validace metody.

	RSD (t_r) [%]	RSD (A) [%]	R^2	LOD [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	LOQ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
Kyselina L-jablečná	0,047	0,522	0,999 9	2,49	9,81
Kyselina D-jablečná	0,082	1,046	0,999 7	4,25	14,18
Kyselina jantarová	0,109	1,041	0,999 9	2,75	9,18
Kyselina citronová	0,043	0,445	0,998 3	3,77	12,57
Kyselina askorbová	0	0,256	0,999 7	0,19	0,63

4.3 Analýza reálných vzorků

Validovaná HPLC metoda byla následně aplikována na vzorky ovocných šťáv. Pro analýzu organických kyselin byly vybrány tři vzorky 100% ovocných šťáv z koncentráту blíže popsané v kapitole 3.4:

- Jablečná Pfanner 100% šťáva vyrobená z koncentrátu
- Pomerančová Pfanner 100% šťáva vyrobená z koncentrátu
- Grapefruitová Pfanner 100% šťáva vyrobená z koncentrátu

Podmínky analýzy a postup přípravy vzorků jsou uvedeny v kapitolách 3.1 a 3.5. Každý 100 × zředěný vzorek byl jednou proměřen. Výsledné chromatogramy jsou na obrázcích 4.7, 4.8 a 4.9. Identifikované píky a vypočtené koncentrace jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulkách 4.7, 4.9 a 4.11.

4.3.1 Jablečná šťáva

Na chromatogramu jablečné šťávy (obrázek 4.7) lze pomocí srovnání s retenčními časy standardů poměrně jasně identifikovat kyselinu jablečnou ($t_R = 1,082$ min) a kyselinu jantarovou ($t_R = 1,304$ min). Méně zřejmá je identifikace prvního píku ($t_R = 1,013$ min), který neodpovídá žádnému z analyzovaných standardů. Je zřejmé, že kyselina D-jablečná se ve vzorku nevyskytuje, neboť se v jejím retenčním čase 1,448 min nevyskytuje žádný pík. Náznak ne zcela separovaného píku lze pozorovat v retenčním čase 1,159 min, může se tedy jednat o pík náležící kyselině citronové.

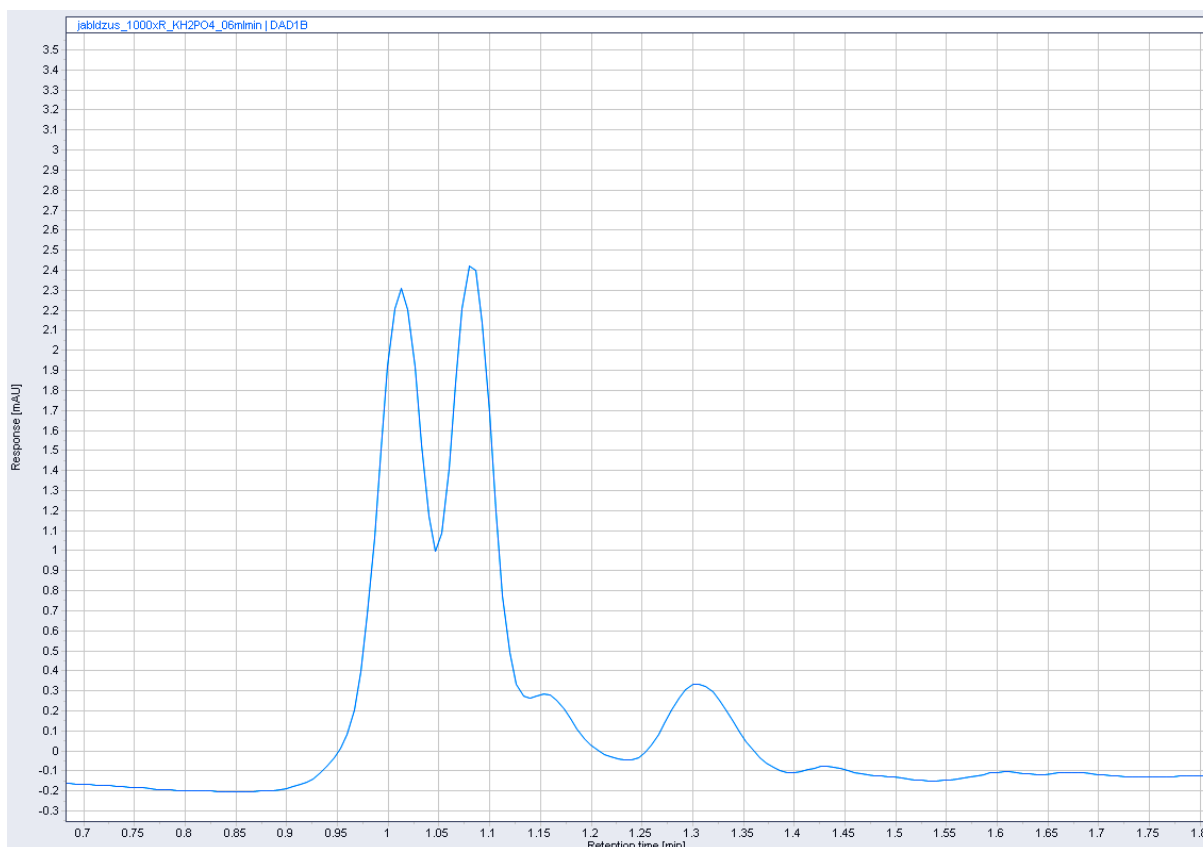
Pro oba identifikované píky byla na základě plochy vypočtena koncentrace a všechny hodnoty jsou shrnuty v tabulce 4.7.

Tabulka 4.7: Látky identifikované v jablečné šťávě.

t_R [min]	Identifikace	A [mAU·min]	c [mg·l ⁻¹]
1,082	kyselina L-jablečná	7,960	10 559,5
1,304	kyselina jantarová	1,733	3 499,4

Obsah kyseliny L-jablečné v jablečné šťávě je podle normy min. 3,00 g·l⁻¹, přičemž kolem stanoveného minima se mohou pohybovat šťávy z extrémně sladkých jablek. Hodnota 10,56 g·l⁻¹, která byla zjištěna ve vzorku jablečné šťávy, poukazuje na to, že obsah kyselin L-jablečné normě vyhovuje. Analyzovaný vzorek splňuje i další normované kritérium, a to nulový obsah kyseliny D-jablečné. Obsah kyseliny citronové nelze s jistotou kvantifikovat, není proto možné vyhodnotit, zda je normou udávaný rozsah 50–200 mg·l⁻¹ splněn [47].

Stanovené hodnoty organických kyselin v jablečné šťávě byly srovnány s normovanými hodnotami v tabulce 4.8.



Obrázek 4.7: Chromatogram organických kyselin v jablečné šťávě.

Tabulka 4.8: Srovnání stanovených organických kyselin v jablečné šťávě s normou ČSN 56 8543 [47]. *n.p.* – není přítomna; *n.s.* – nebyla stanovena.

	Normované hodnoty	Výsledek měření	Soulad s normou
Kyselina mléčná	max. 0,5 g·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–
Kyselina citronová	50–200 mg·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–
Kyselina D-jablečná	<i>n.p.</i>	<i>n.p.</i>	✓
Kyselina L-jablečná	min. 3,0 g·l ⁻¹	10,559 5 g·l ⁻¹	✓
Kyselina fumarová	max. 5,0 mg·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–

4.3.2 Pomerančová šťáva

V chromatogramu získaném analýzou pomerančové šťávy (obrázek 4.8) lze identifikovat zřetelný pík kyseliny citronové ($t_R = 1,159$ min). Další pík pravděpodobně náleží kyselině askorbové ($t_R = 1,072$ min). V retenčním čase kyseliny D-jablečné 1,425 min se nevyskytuje identifikovatelný pík, lze tedy také tvrdit, že kyselina D-jablečná se ve vzorku pomerančové šťávy nevyskytuje.

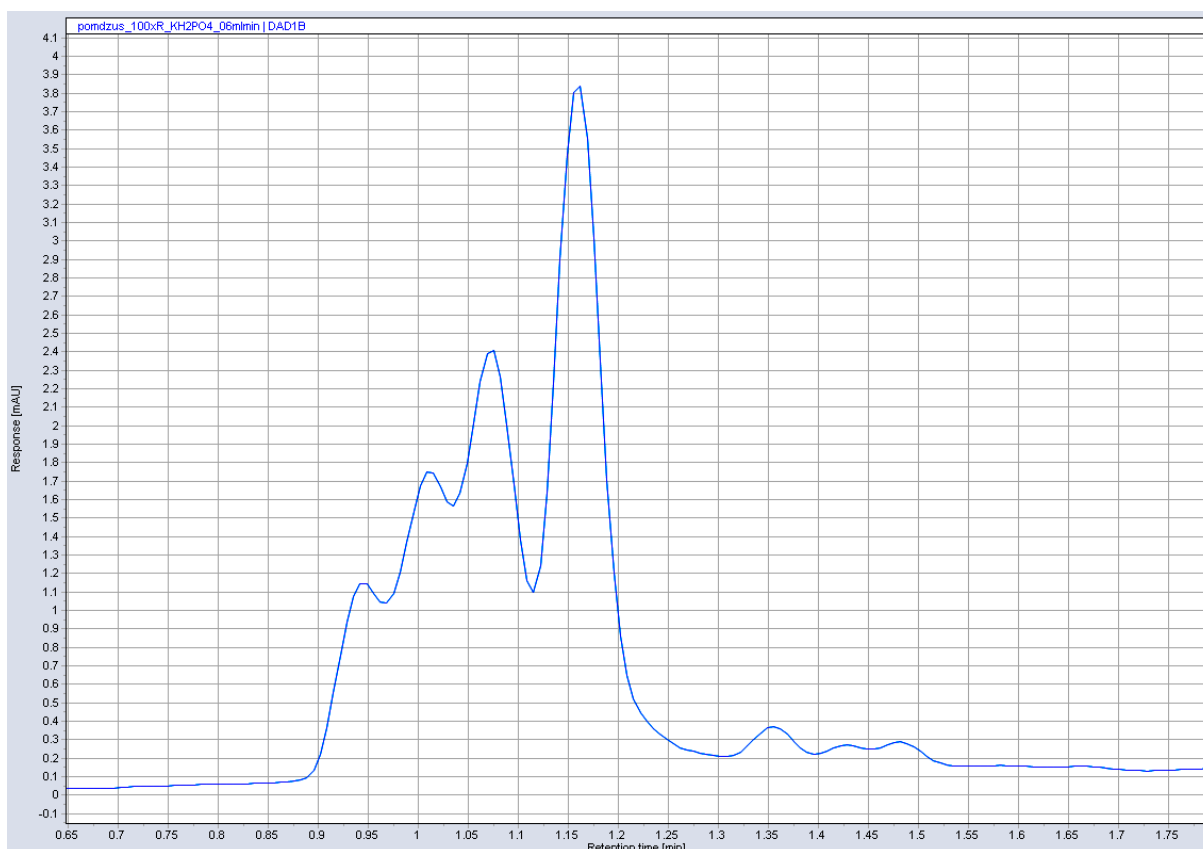
Retenční časy, plochy a vypočtené koncentrace jsou shrnuty v tabulce 4.9.

Obsah kyseliny citronové v pomerančové šťávě se podle normy pohybuje v rozmezí 6,3–17,0 g·l⁻¹. Naměřená hodnota 14,37 g·l⁻¹ toto kritérium splňuje. Množství identifikované kyseliny askorbové 1,48 g·l⁻¹ je poměrně vysoké vzhledem k údajům o jejím obsahu v pomerančích; literatura udává 300–600 mg·l⁻¹ [5]. Zde mohlo dojít ke společné eluci kyseliny

liny askorbové a kyseliny L-jablečné, která se v pomerančích může vyskytovat v množství 0,8–3,0 g·l⁻¹ [48]. Obě látky mají podobné retenční časy a kvůli nízkému rozlišení metody není údaj o množství kyseliny askorbové a L-jablečné prokazatelný.

Tabulka 4.9: Látky identifikované v pomerančové šťávě.

t_R [min]	Identifikace	A [mAU·min]	c [mg·l ⁻¹]
1,159	kyselina citronová	12,685	14 367,2
1,078	kyselina askorbová	8,202	1 484,7



Obrázek 4.8: Chromatogram organických kyselin v pomerančové šťávě.

Stanovené hodnoty organických kyselin v pomerančové šťávě byly srovnány s normovanými hodnotami v *tabulce 4.10*.

Tabulka 4.10: Srovnání stanovených organických kyselin v pomerančové šťávě s normou ČSN 56 8541 [48]. *n.p.* – není přítomna; *n.s.* – nebyla stanovena.

	Normované hodnoty	Výsledek měření	Soulad s normou
Těk. k. (k. octová)	max. 0,4 g·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–
Kyselina mléčná	max. 0,5 g·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–
Kyselina citronová	6,3–17,0 g·l ⁻¹	14,367 2 g·l ⁻¹	✓
Kyselina L-jablečná	0,8–3,0 g·l ⁻¹	<i>n.s.</i>	–
Kyselina D-jablečná	<i>n.p.</i>	<i>n.p.</i>	✓

4.3.3 Grapefruitová šťáva

V chromatogramu grapefruitové šťávy (obrázek 4.9) lze identifikovat zřetelný pík kyseliny citronové v retenčním čase $t_R = 1,163$ min. Kyselina askorbová je pravděpodobně eluována v čase $t_R = 1,066$ min.

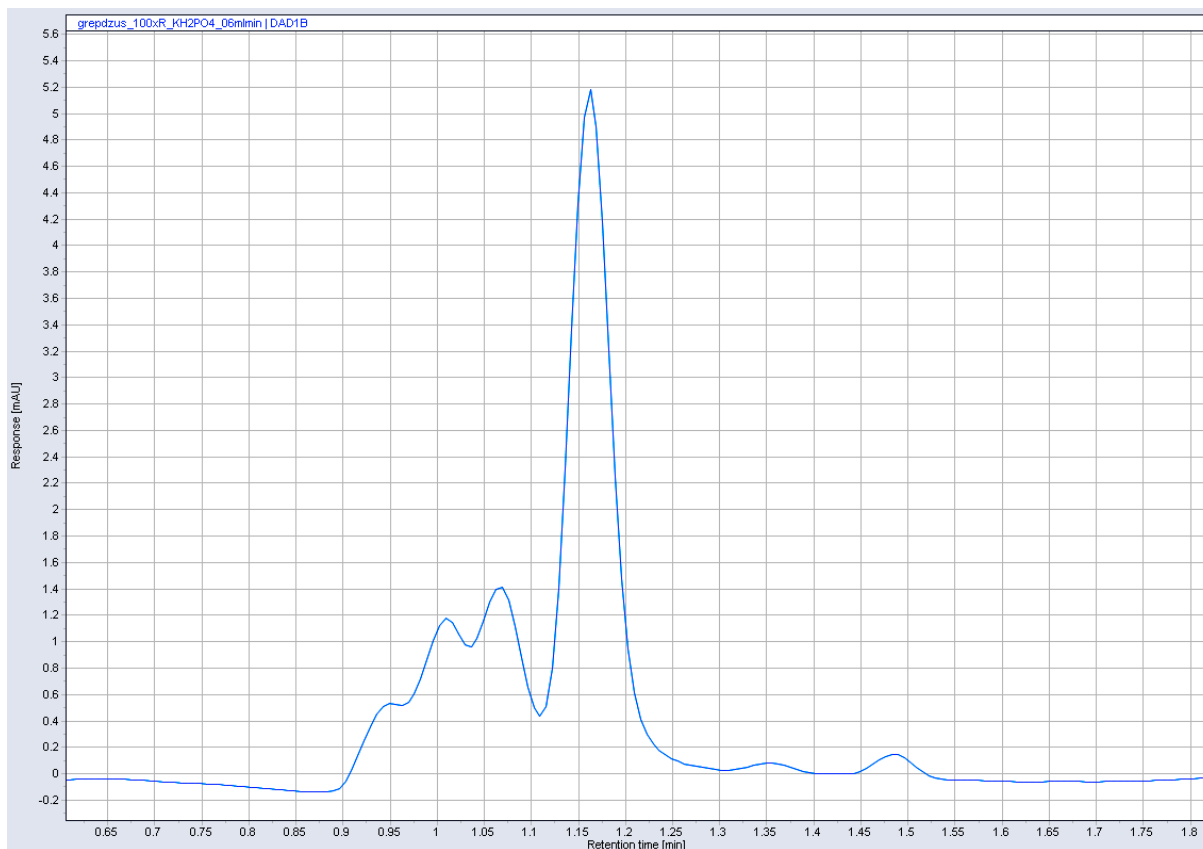
Hodnoty jsou shrnuty v tabulce 4.11.

Tabulka 4.11: Látky identifikované v grapefruitové šťávě.

t_R [min]	Identifikace	A [mAU·min]	c [mg·l ⁻¹]
1,162	kyselina citronová	16,023	17 960,3
1,067	kyselina askorbová	4,353	1 100,4

Normou udávaný obsah kyseliny citronové v grapefruitové šťávě je 8,0–20,0 g·l⁻¹ [49]. Hodnota získaná analýzou vzorku grapefruitové šťávy 17,96 g·l⁻¹ tomuto kritériu vyhovuje. Obsah kyseliny askorbové byl vyhodnocen na 1,10 g·l⁻¹, avšak opět mohlo dojít ke společné eluci s kyselinou L-jablečnou, která se v grapefruitové šťávě vyskytuje v množství 0,2–1,2 g·l⁻¹ [49]. Literatura udává obsah kyseliny askorbové v grapefruitech na 140–700 mg·kg⁻¹ [5], je tedy pravděpodobné, že nepřesnost vznikla právě kvůli blízkým retenčním časům kyseliny askorbové a L-jablečné a nízkému rozlišení metody.

Stanovené hodnoty organických kyselin v grapefruitové šťávě byly srovnány s normou udávanými hodnotami v tabulce 4.12.



Obrázek 4.9: Chromatogram organických kyselin v grapefruitové šťávě.

Tabulka 4.12: Srovnání stanovených organických kyselin v grapefruitové šťávě s normou ČSN 56 8542 [49]. *n.p.* – není přítomna; *n.s.* – nebyla stanovena.

	Normované hodnoty	Výsledek měření	Soulad s normou
Těk. k. (k. octová)	max. $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	<i>n.s.</i>	–
Kyselina mléčná	max. $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	<i>n.s.</i>	–
Kyselina citronová	$8,0\text{--}20,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	$17,9603 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	✓
Kyselina L-jablečná	$0,2\text{--}1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$	<i>n.s.</i>	–
Kyselina D-jablečná	<i>n.p.</i>	<i>n.p.</i>	✓

5 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zavedení RP-HPLC metody vhodné pro ověřování obsahu organických kyselin v ovocných šťávách.

Byla použita kolona Kinetex Polar C18 a analýza byla provedena s mobilní fází 20 mMol fosforečnanu draselného, pH=1,5. Hodnota pH mobilní fáze má na retenci zásadní vliv, je vhodné, aby byla 1–2 jednotky pH pod hodnotou pK_a analytů. Pro analýzu byl krátkou optimalizací zvolen průtok mobilní fáze $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, nástřík vzorku $1 \mu\text{m}$ a teplota kolony $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Ze šesti standardů organických kyselin byly pro analýzy vybrány tři (jablečná, citronová a jantarová) a pro její podobné retenční charakteristiky byla přidána kyselina askorbová. Pro tyto čtyři látky byla provedena validace metody.

Opakovatelnost byla stanovena pomocí šesti opakovaných nástříků téže koncentrační hladiny. Relativní směrodatná odchylka pro opakovatelnost podle retenčních časů se pohybovala v rozsahu 0–0,109 % RSD. Opakovatelnost ploch píků byla v rozsahu 0,256–1,046 % RSD.

Linearita byla stanovena pomocí postupné analýzy vzorků šesti koncentračních hladin každého ze standardů. Ze získaných hodnot byly sestrojeny kalibrační závislosti a hodnoty korelačních parametrů R^2 se pro všechny analyzované látky pohybovaly v rozsahu 0,998 3–0,999 9.

Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny na základě výšky píků a šumu základní linie. LOD se pohyboval v rozsahu $0,19\text{--}4,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a LOQ v rozsahu $0,63\text{--}14,18 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Metoda se ukázala být nejcitlivější pro kyselinu askorbovou.

Validovanou metodou byly analyzovány vzorky tří 100% ovocných šťáv. V jablečné šťávě byla identifikována kyselina L-jablečná v koncentraci $10,56 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a kyselina jantarová v koncentraci $3,50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Ve vzorku pomerančové šťávy bylo stanoveno $14,37 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny citronové, v grapefruitové šťávě $17,96 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Kyselina askorbová byla stanovena na $1,48 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v pomerančové šťávě a $1,10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v grapefruitové šťávě. Bylo potvrzeno, že v žádné analyzované šťávě se nevyskytuje kyselina D-jablečná, lze tedy usuzovat, že neobsahují přídavek syntetické kyseliny jablečné.

Analýza organických kyselin na HPLC systému reverzních fází je analýza neobvyklá, neboť se analyzují polární analyty na nepolární stacionární fázi. Skýtá ale možnost použití vodných mobilních fází, což činí analýzu levnější a celkově méně náročnou. Organické kyseliny je v silně kyselém prostředí možné účinně rozdělit v poměrně krátkých analýzách.

Metoda je vhodná pro stanovení některých organických kyselin v ovocných šťávách; jiné byly naopak eluovány společně a nebylo dosaženo dostatečného rozlišení pro jejich separaci. Při použití metody za stávajících podmínek je třeba nízké rozlišení brát v úvahu a metodu kombinovat s jinými metodami.

V další práci by bylo vhodné metodu optimalizovat pro zvýšení rozlišení.

Seznam symbolů a zkratek

RP-HPLC Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi)

HPLC High Performance Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

RP-HPLC Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi)

LC Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)

GC Gas Chromatography (plynová chromatografie)

GC-FID Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)

GC-MS Gas Chromatography-Mass Spectrometry (plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí)

BGE Background Electrolyte (základní elektrolyt)

PEEK polyetherketon

DAD Diode-array Detector (detektor diodového pole)

ELSD Evaporative Light Scattering Detector

CAD Charged Aerosol Detector

NQAD Nano Quantity Analyte Detector

FDA Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)

LOQ Limit of quantification (mez stanovitelnosti)

LOD Limit of detection (mez detekce)

UV Ultraviolet (ultrafialový)

UV-VIS Ultraviolet-visible (ultrafialovo-viditelný)

ACN acetonitril

EU European Union (Evropská unie)

ES Evropské společenství

ČSN chráněné označení českých technických norem

SNIF-NMR Site-specific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance (analýza izotopového zastoupení prvků ve složkách vzorků)

HPAEC-PAD High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (vysokoučinná aniontová chromatografie s pulzně amperometrickou detekcí)

EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)

ODS Octadecylsilicagel (oktadecylsilikagel)

TOF Time of Flight (analyzátor doby letu)

Q Quadrupol (kvadrupol)

OFAT One Factor at Time (jednorozměrná analýza)

MDH malátdehydrogenasa

LDH laktátdehydrogenasa

CL citrátlyasa

GOT Glutamic-oxaloacetic transaminase

NADH, NADPH nikotinamidadenindinukleotid, nikotinamidadenindinukleotidfosfát

SD Standard Deviation (směrodatná odchylka)

RSD Relative Standard Deviation (relativní směrodatná odchylka)

NMR Nuclear Magnetic Resonance (nukleární magnetická resonance)

Seznam obrázků

2.1	Schéma HPLC systému.	20
2.2	Kvalitativní a kvantitativní charakteristiky chromatografického procesu. . .	21
2.3	Znázornění separace polárních a nepolárních látek na RP-HPLC.	23
2.4	Šum a drift na základní linii.	25
2.5	Schéma detektoru s diodovým polem.	26
2.6	Kroky ve vývoji a optimalizaci HPLC metody.	27
2.7	Základní kroky ve validačním procesu.	27
2.8	Validační parametry.	28
3.1	Vzorky ovocných šťáv.	35
4.1	Ukázkový chromatogram.	39
4.2	Separace na RP-HPLC.	40
4.3	Průtok mobilní fáze $4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	41
4.4	Průtok mobilní fáze $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$	41
4.5	Srovnání různých objemů nástřiku vzorku na kolonu.	42
4.6	Proložené píky standardů.	43
4.7	Chromatogram organických kyselin v jablečné šťávě.	53
4.8	Chromatogram organických kyselin v pomerančové šťávě.	54
4.9	Chromatogram organických kyselin v grapefruitové šťávě.	56

Seznam tabulek

2.1	Složení vybraného ovoce.	8
2.2	Vlastnosti vybraných organických kyselin.	11
3.1	Vlastnosti kyseliny jablečné.	33
3.2	Vlastnosti kyseliny jantarové.	33
3.3	Vlastnosti kyseliny citronové.	33
3.4	Vlastnosti kyseliny mléčné.	34
3.5	Vlastnosti kyseliny octové.	34
3.6	Vlastnosti kyseliny vinné.	34
3.7	Vlastnosti kyseliny askorbové.	34
4.1	Opakovatelnost metody podle retenčních časů.	44
4.2	Opakovatelnost metody podle ploch píků.	44
4.3	Koncentrace a plochy píků jednotlivých standardů.	44
4.4	Hodnoty korelačních koeficientů.	47
4.5	Mez detekce, mez stanovitelnosti.	50
4.6	Výsledky validace metody.	51
4.7	Látky identifikované v jablečné šťávě.	52
4.8	Srovnání stanovených organických kyselin v jablečné šťávě s normou ČSN 56 8543.	53
4.9	Látky identifikované v pomerančové šťávě.	54
4.10	Srovnání stanovených organických kyselin v pomerančové šťávě s normou ČSN 56 8541.	55
4.11	Látky identifikované v grapefruitové šťávě.	55
4.12	Srovnání stanovených organických kyselin v grapefruitové šťávě s normou ČSN 56 8542.	56
5.1	Hodnoty udávané pro jablečné šťávy normou ČSN 56 8543.	63
5.2	Hodnoty udávané pro pomerančové šťávy normou ČSN 56 8541.	63
5.3	Hodnoty udávané pro grapefruitové šťávy normou ČSN 56 8542.	63

Seznam grafů

4.1	Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny L-jablečné.	45
4.2	Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny D-jablečné.	45
4.3	Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny jantarové.	46
4.4	Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny citronové.	46
4.5	Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyseliny askorbové.	47
4.6	Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny L-jablečné.	48
4.7	Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny D-jablečné.	48
4.8	Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny jantarové.	49
4.9	Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny citronové.	49
4.10	Závislost výšky píku na koncentraci kyseliny askorbové.	50

Přílohy

Tabulka 5.1: Hodnoty udávané pro jablečné šťávy normou ČSN 56 8543. *n.p.* – není přítomna [47].

JABLEČNÁ ŠTÁVA	Jednotky	Požadavky
Kyselina mléčná	g/l	max. 0,5
Kyselina D-jablečná	mg/l	<i>n.p.</i>
Titrovatelná kyselost při pH 8,1	g/l	3,3 - 7,5
Kyselina L-jablečná	g/l	min. 3,0
Kyselina fumarová	mg/l	max 5,0

Tabulka 5.2: Hodnoty udávané pro pomerančové šťávy normou ČSN 56 8541. *n.p.* – není přítomna [48].

POMERANČOVÁ ŠTÁVA	Jednotky	Požadavky
Těk.k.jako k. octová	g/l	max. 0,4
Kyselina mléčná	g/l	max. 0,5
Kyselina D-jablečná	mg/l	<i>n.p.</i>
Titrovatelná kyselost při pH 8,1	g/l	5,8 - 15,4
Kyselina citronová	g/l	6,3 - 17,0
Kyselina D-isocitronová	mg/l	65 - 200
Poměr k.citr.:isocitr.		max. 130
Kyselina L-jablečná	g/l	0,8 - 3,0

Tabulka 5.3: Hodnoty udávané pro grapefruitové šťávy normou ČSN 56 8542. *n.p.* – není přítomna [49].

GRAPEFRUITOVÁ ŠTÁVA	Jednotky	Požadavky
Těk.k.jako k. octová	g/l	max. 0,4
Kyselina mléčná	g/l	max. 0,5
Kyselina D-jablečná	mg/l	<i>n.p.</i>
Titrovatelná kyselost při pH 8,1	g/l	7,7 - 18,5
Kyselina citronová	g/l	8 - 20
Kyselina D-isocitronová	mg/l	140 - 350
Poměr k.citr.: k.isocitr.		50 - 95
Kyselina L-jablečná	g/l	0,2 - 1,2

Literatura

- [1] LASZTITY, Radomír. *Food quality and standards*. Vol. 2. Oxford, U.K.: Eolss Publishers, 2009. ISBN 978-190-5839-421.
- [2] BELITZ, Hans-Dieter, Werner GROSCH a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th ed. Berlin: Springer, 2009. ISBN 978-3-540-69933-0.
- [3] HUI, Y. H. a József BARTA. *Handbook of fruits and fruit processing*. Ames, Iowa: Blackwell Pub., 2006. ISBN 978-0-8138-1981-5.
- [4] SHERMAN, Henry C. *Chemistry of food and nutrition*. 7th ed. New York: Macmillan, 1949. ISBN 2-250328.
- [5] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Vyd. 2. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
- [6] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-02-X.
- [7] G. B. SEYMOUR, J. E. TAYLOR a G. A. TUCKER. *Biochemistry of fruit ripening*. Dordrecht: Springer, 1993. ISBN 978-940-1115-841.
- [8] Mahdalová, M. *Stanovení aromaticky aktivních látek v odrůdách jablek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 101 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [9] RIEKSTINA-DOLGE Rita, Zanda KRUMA, Daina KARKLINA and Dalija SEGLINA, *Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration*, *Procedia Food Science*. 2011. (1). 1709-1716. [cit. 2018-03-16]. DOI:10.1016/j.profoo.2011.09.252. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002537>
- [10] BUETTNER A. and P. SCHIEBERLE. *Evaluation of Key Aroma Compounds in Hand-Squeezed Grapefruit Juice (Citrus paradisi Macfayden) by Quantitation and Flavor Reconstitution Experiments*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001 (3). 1358-1363. [cit. 2018-03-27] DOI: 10.1021/jf001235x. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001235x>
- [11] ZHANG Y. et al. *Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jincheng Sweet Orange Fruit (Citrus sinensis (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O*. *Molecules*. 2008 (13). 1333-1344. [cit. 2018-02-27] DOI: 10.3390/molecules13061333. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/6/1333>
- [12] VEČEŘA, Miroslav. *Chemické tabulky organických sloučenin*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1975. Řada chemické literatury. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:866e05f0-1912-11e3-9319-005056827e51>

- [13] *Multimediální učebnice "Příklady z analytické chemie"*. Univerzita Palackého v Olomouci. [online]. [cit. 2018-03-12]. Dostupné z: ach.upol.cz/ucebnice.
- [14] DYR, Josef. *Organické kyseliny a rozpustidla Díl II - Organické kyseliny*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1957.
- [15] MÁROVÁ, Ivana. *Biotechnologie II* [ppt prezentace]. Brno: Fakulta chemická VUT. 18. 11 2017.
- [16] WINTER, Ruth. *A consumer's dictionary of food additives*. 7th ed. New York: Three Rivers Press, 2009. ISBN 978-030-7452-597.
- [17] SKURRAY, Geoffrey. *Decoding food additives: a comprehensive guide to food additive codes and food labelling*. South Melbourne: Lothian Books, 2006. ISBN 978-073-4409-225.
- [18] VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme? aneb: průvodce "Éčky"v potravinách*. EcoHouse, 2001. ISBN 978-802-3875-041. Dostupné také z <http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Agronavigator/Sukova2/Ecka.pdf>
- [19] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [20] ČÍŽKOVÁ, Helena. *Metody a kritéria pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Ostrava: Key Publishing, 2011. ISBN 978-80-7418-124-5.
- [21] Vyhláška č. 335/1997 Sb. *Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líc, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí*. [online] [cit. 2018-03-12]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-335#oddil1>
- [22] WIDMER, Wilbur W., Paul F. CANCELON and Steven NAGY. *Methods for determining adulteration of citrus juices*. Trends in Food Science & Technology. 1992 (3). 278-286. [cit. 2018-03-12]. DOI:10.1016/S0924-2244(10)80012-3. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224410800123>
- [23] *Analysis of Organic Acids*. Centre for food safety [online]. [cit. 2018-03-18] Dostupné z: http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_nifl/files/Analysis_of_Organic_Acids_2370.pdf
- [24] ČSN EN 12147 (560418) A Ovocné a zeleninové šťávy - Stanovení titrační kyselosti. Praha: Český normalizační institut, 1998.
- [25] ČSN EN 12138 (560429) Ovocné a zeleninové šťávy - Enzymatické stanovení obsahu kyseliny D-jablečné - NAD spektrofotometrická metoda. Praha: Český normalizační institut, 1998.
- [26] ČSN EN 12147 (560418) Ovocné a zeleninové šťávy. Enzymové stanovení obsahu kyseliny L-jablečné (L-malátu). NADH spektrofotometrická metoda. Praha: Český normalizační institut, 1996.

- [27] ČSN EN 12147 (560418) Ovocné a zeleninové šťávy. Enzymové stanovení obsahu kyseliny citronové (citrátu). NADH spektrofotometrická metoda. Praha: Český normalizační institut, 1996.
- [28] GALLI, V. et al. *Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples*. Electrophoresis. 2003 (24). 1951–1981. [cit. 2018-03-27] DOI: 10.1002/elps.200305473. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.200305473>
- [29] SUH, Ja Won et al. *GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography*. Clinical Chemistry. 1997 (12). 2256-1261. [cit. 2018-03-05]. ISSN: 0009-9147. Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnl.org/content/43/12/2256>
- [30] DEVLIN, Thomas M. *Enzymatic Methods in Analytical Chemistry*. Analytical Chemistry. 1959 (6). [cit. 2018-03-13] DOI: 10.1021/ac60150a041. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/231197838_Enzymatic_Methods_in_Analytical_Chemistry
- [31] BISSWANGER, Hans. *Enzyme assays*. Perspectives in Science. 2014 (1). 41-55. [cit. 2018-03-27] ISSN 2213-0209, DOI: 10.1016/j.pisc.2014.02.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213020914000068>
- [32] *CHROMacademy: The worlds largest e-Learning website for analytical scientists* [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: www.chromacademy.com
- [33] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [34] RAMOS, Fernando. *Liquid chromatography: principles, technology and applications*. New York: Nova, 2013. Chemical engineering methods and technology. ISBN 978-1-62618-678-1.
- [35] FANALI, Salvatore. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [36] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha: 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [37] *HPLC, High Performance Liquid Chromatography*. [online]. [cit. 2018-02-29]. Dostupné z: www.hplc.cz
- [38] SWARTZ, Michael and Ira S. KRULL. *Handbook of analytical validation*. Boca Raton: CRC Press, 2012. ISBN 978-0-8247-0689-0.
- [39] *General Principles of software validation; Guidance for Industry and FDA Staff*. USA: FDA. 11. 1. 2002. Dostupné z: [urlhttps://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../ucm085371.pdf](https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../ucm085371.pdf)
- [40] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Instrumentální a strukturní analýza* [ppt prezentace]. Brno: Fakulta chemická VUT. 5. 2. 2017.

- [41] SUCHÁNEK, Miloslav a David MILDE. *Stanovení nejistoty analytického měření: pokyn EURACHEM/CITAC*. Vyd. 4. Praha: Eurachem - ČR, 2014. Kvalimetrie: řada příruček pro laboratoře. ISBN 978-80-86322-07-0.
- [42] *PENTA - Výrobce a dodavatel čistých, laboratorních, speciálních, farmaceutických a technických chemikálií* [online]. [cit. 2018-04-15] Dostupné z: <https://www.pentachemicals.eu/bezpecnostni-listy.php?subcat=12#seznam>
- [43] BAREK, J. a kol. *Nomenklatura a terminologie. Metrologická terminologie v chemii*. Chemické listy. 2000 (7). 439–444. [online] [cit. 2018-03-21] ISSN 1213-7103. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/230806647_METROLOGICKA_TERMINOLOGIE_V_CHEMII.
- [44] HENDL, Jan. *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat*. Vyd. 5. Praha: Portál, 2015. ISBN 978-80-262-0981-2.
- [45] *Phenomenex UHPLC, HPLC, SPE, GC - Leader in Analytical Chemistry Solutions* [online]. [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: www.phenomenex.com/Application/Detail/24268?returnURL=/Kinetex/ApplicationSearch.
- [46] *Phenomenex UHPLC, HPLC, SPE, GC - Leader in Analytical Chemistry Solutions* [online]. [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/kinetex-hplc-uhplc-columns-tips-for-care-and-use.pdf
- [47] ČSN 56 8543. *Ovocné a zeleninové šťávy - Jablečná šťáva*. Praha: Český normalizační institut, 2001. Dostupné také z: <http://csnonline.agentura-cas.cz/>
- [48] ČSN 56 8541. *Ovocné a zeleninové šťávy - Pomerančová šťáva*. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [49] ČSN 56 8542. *Ovocné a zeleninové šťávy - Grapefruitová šťáva*. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [50] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [51] *Industrial processing of citrus fruit*. 2th ed. New York: United Nations, 1969. Food Industry Studies.
- [52] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [53] *Validační program pro statistické zpracování analytických dat*. [online] [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm
- [54] HENDL, J.: *Přehled statistických metod zpracování dat*. Praha: Portál, 2004. ISBN 80-7178-820-1.
- [55] SHUI, Guanghou and Lai Peng LEONG. *Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. [online]. 2002. (1). 89-96 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01345-6. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302013456>.

- [56] GRISWOLD, John R. and Richard A. RAUNER. *Analysis of organic acids: A freshman laboratory experiment* Journal of Chemical Education. 1990 (6), 516. [cit. 2018-03-30] DOI: 10.1021/ed067p516. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed067p516>
- [57] EHLING, Stefan and Shannon COLE. *Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid ChromatographyMass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing.* Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2011 (59). 2229–2234. [cit. 2018-03-15] DOI:10.1021/jf104527e. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104527e>
- [58] RODRIGUES, J.E.A. et al. *Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods.* 2010 (2). 166-175. [cit. 2018-03-21] DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.029. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010008226>
- [59] BERGMAYER Hans Ulrich and Erich BERNT. *UV-Assay with Pyruvate and NADH In Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press. 1974 (2). 574-579. [cit. 2018-03-27] ISBN 9780120913022. DOI: 10.1016/B978-0-12-091302-2.50010-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120913022500104>