

Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné metodou HPLC

Bc. Kristýna Šestáková

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna ŠESTÁKOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce: **Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Zpracovat teorii týkající se organických kyselin s důrazem na kyselinu jablečnou a vinnou.
- Popsat princip kapalinové chromatografie a zaměřit se na detekci pomocí elektrochemického detektoru a UV-VIS.

II. Praktická část

- Za daných podmínek ověřit, vyzkoušet možnosti detekce výše jmenovaných organických kyselin při modifikaci chromatografických podmínek.
- Ze zjištěných výsledků vytvořit návrh či doporučení pro optimální stanovení těchto kyselin v našich laboratorních podmínkách.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 1999.

[2] DAVÍDEK, J. a kol. *Chemie potravin*, SNTL, Praha 1989.

[3] LLOYD, R.S. et al. *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, New York, 1988.

[4] WROLSTAD, R. E. *Handbook of food analytical chemistry*, Wiley Interscience, 2005.

[5] ASHURST, P. R. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*, Wiley Interscience, 2007.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2009

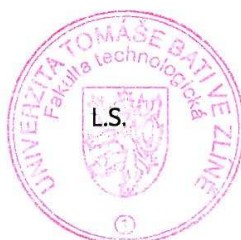
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Organické kyseliny je možné detekovat několika různými metodami. Cílem práce bylo najít optimální podmínky pro stanovení kyseliny jablečné a vinné vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí. V systému byly postupně použity dvě analytické kolony Ascentis™ C18, Discovery C18 a čtyři mobilní fáze. Separace probíhala v režimu obrácených fází. Slabých výsledků bylo dosaženo při použití mobilní fáze redestilovaná voda (rH₂O), metanol (Met-OH) a H₃PO₄ v poměru 0,5 : 99 : 0,5 a 0,05 mol.dm⁻³ KH₂PO₄ o pH 3 (fosfátový pufr). Pro detekci bude nutné používat napětí na elektrodách vyšší než 500 mV. V práci byly navrženy různé možnosti pro zlepšení separace a detekce.

Klíčová slova: organické kyseliny, kyselina jablečná, kyselina vinná, HPLC-ECD, reverzní fáze, HPLC

ABSTRACT

Organic acids are possible to detection with several varied methods. The aim of this thesis was to discovered optimal conditions for determination malic and tartaric acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. It was tested two analytical columns Ascentis™ C18, Discovery C18 and four mobile phases. The separation was proceed by/on the reverse phase chromatography. Only slight result was obtained with redestilled water, methanol and phosphoric acid and phosphate buffer as a mobile phase. For detection is necessary to use a higher potential than 500 mV. In this thesis there are suggested varieties of possibilities for modification of separation and detection.

Keywords: organic acids, malic acid, tartaric acid, HPLC-ECD, reverse phase, HPLC

Ráda bych touto cestou vyjádřila své díky Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a trpělivost při zpracovávání daného tématu.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 8 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 1 ORGANICKÉ KYSELINY | 10 |
| 1.1 VLASTNOSTI ORGANICKÝCH KYSELIN | 10 |
| 1.1.1 Acidita | 11 |
| 1.1.2 Fyzikální vlastnosti | 11 |
| 1.1.3 Reakce organických kyselin..... | 12 |
| 1.2 ORGANICKÉ KYSELINY V POTRAVINÁCH | 13 |
| 1.2.1 Acidulanty | 13 |
| 1.2.2 Konzervanty | 14 |
| 1.3 VYJADŘOVÁNÍ KYSELOSTI V POTRAVINÁCH..... | 14 |
| 1.3.1 Titrační kyselost..... | 15 |
| 1.3.2 Aktivní kyselost | 16 |
| 1.4 KYSELINA JABLEČNÁ..... | 17 |
| 1.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti | 17 |
| 1.4.2 Výskyt v přírodě a výroba..... | 17 |
| 1.4.3 Využití v potravinářském průmyslu..... | 19 |
| 1.5 KYSELINA VINNÁ | 19 |
| 1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti | 20 |
| 1.5.2 Výskyt v přírodě a výroba..... | 20 |
| 1.5.3 Využití v potravinářském průmyslu..... | 21 |
| 2 CHROMATOGRRAFIE | 23 |
| 2.1 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD | 23 |
| 2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE - HPLC..... | 25 |
| 2.2.1 Součásti aparatury HPLC..... | 26 |
| 2.2.2 Kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) | 29 |
| 2.2.3 Elektrochemický detektor (ECD)..... | 30 |
| 2.2.4 Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné pomocí HPLC..... | 32 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 34 |
| 3 METODIKA PRÁCE..... | 35 |
| 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE..... | 35 |
| 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY..... | 35 |
| 3.3 PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ PRO ANALÝZU | 36 |
| 3.3.1 Příprava mobilní fáze 1 | 36 |
| 3.3.2 Příprava mobilní fáze 2 | 36 |
| 3.3.3 Příprava mobilní fáze 3 | 36 |
| 3.3.4 Příprava mobilní fáze 4 | 37 |
| 3.3.5 Příprava standardů (vzorků) pro analýzu | 37 |
| 3.4 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY | 37 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 38 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 4.1 | MOŽNOSTI DETEKCE KYSELINY JABLEČNÉ A VINNÉ NA KOLONĚ ASCENTIS™ C18 s ECD DETEKČÍ | 38 |
| 4.1.1 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 1 | 38 |
| 4.1.2 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 2 | 39 |
| 4.1.3 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 4 | 41 |
| 4.1.4 | Kyselina vinná v mobilní fázi 1 | 43 |
| 4.1.5 | Kyselina vinná v mobilní fázi 2 | 44 |
| 4.1.6 | Kyselina vinná v mobilní fázi 3 | 45 |
| 4.1.7 | Kyselina vinná v mobilní fázi 4 | 46 |
| 4.2 | MOŽNOSTI DETEKCE KYSELINY JABLEČNÉ A VINNÉ NA KOLONĚ DISCOVERY C18 s ECD DETEKČÍ | 48 |
| 4.2.1 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 1 | 48 |
| 4.2.2 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 3 | 50 |
| 4.2.3 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 4 | 51 |
| 4.2.4 | Kyselina vinná v mobilní fázi 1 | 53 |
| 4.2.5 | Kyselina vinná v mobilní fázi 3 | 54 |
| 4.2.6 | Kyselina vinná v mobilní fázi 4 | 55 |
| 4.3 | STANOVENÍ KYSELINY JABLEČNÉ A VINNÉ NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 s UV-VIS DETEKČÍ | 57 |
| 4.4 | DISKUZE | 57 |
| | ZÁVĚR..... | 61 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 62 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 68 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 70 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 72 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 73 |

ÚVOD

Organické kyseliny jsou významným faktorem pro údržnost a nutriční kvalitu celé řady potravin a zároveň jsou nositelem kyselé chuti. Ačkoliv bývá celkový obsah kyselin v potravinách relativně nízký, až na výjimky kolem 1 až 3 hmot. %, jejich význam je široký. Pro potravinářský průmysl jsou důležitým kritériem aktivní a titrační kyselost. Aktivní kyselost, tedy hodnota pH, je rozhodujícím znakem pro konzervářské technologie, titrační kyselost je hodnota odpovídající všem kyselé reagujícím složkám v potravine. I když se titrační kyselost vyjadřuje v přepočtu na konkrétní kyselinu, nepodává žádné bližší informace o zastoupení jednotlivých kyselin.

Pro stanovení jednotlivých organických kyselin v potravinách je možné využívat celé řady různých metod zahrnující metody enzymatické, elektrochemické, volumetrické a chromatografické. Právě rychle se rozvíjející vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) přináší řadu metod a možností pro stanovení organických kyselin.

Elektrochemické detektory dosahují značné citlivosti a senzitivity. Jsou založeny na principu oxidačně-redukčních reakcí, spojených s přenosem elektronů.

Zjištění zastoupení jednotlivých kyselin může vypovídat o kvalitě či zralosti suroviny, případně může být ukazatelem falšování potravin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ORGANICKÉ KYSELINY

Jsou to organické sloučeniny, které mají ve své molekule přítomnou karboxylovou skupinu (-COOH). Tato karboxylová skupina je kyselého charakteru a snadno odštěpuje vodíkový atom, čímž vzniká karboxylátový anion. Odtržením hydroxylové skupiny -OH vznikají acyly, při odštěpení COO^- dochází k zániku karboxylové skupiny, k tzv. dekarboxylaci.

Samotné karboxylové kyseliny můžeme rozdělit do několika skupin. Dělit je můžeme podle typu uhlíkatého řetězce (alifatické, aromatické), podle hybridního stavu atomů uhlíku (nasyčené, nenasycené), podle počtu skupin -COOH (mono-, di- až polykarboxylové) nebo podle druhu substituentů (aminokyseliny, halogenkyseliny...).

Od karboxylových kyselin jsou odvozeny dva typy derivátů. Při reakcích, kdy dochází k modifikaci karboxylové skupiny vznikají deriváty funkční, deriváty substituční vznikají záměnou některého nebo i více atomů vodíku v řetězci, přičemž karboxylová skupina zůstává zachována.

Organické kyseliny jsou v přírodě značně rozšířené a setkáváme se s nimi jak v rostlinných, tak v živočišných materiálech. Z rostlinných materiálů jsou to zejména listy, plody, semena apod. Kyseliny nacházíme většinou ve volné formě, v materiálech živočišného původu pak většinou vázané ve formě solí a esterů.

Organické kyseliny a jejich deriváty se účastní řady biochemických pochodů (energetický metabolismus, regulační pochody...). Jsou významnou složkou řady potravin a nápojů, kde se významně podílí na organoleptických a technologických vlastnostech [1] [2].

1.1 Vlastnosti organických kyselin

Většina karboxylových kyselin jsou až na výjimky slabé či velmi slabé kyseliny, které ve vodném roztoku disociují. Mohou vytvářet vodíkové můstky mezi karboxyly jednotlivých kyselin za vzniku dimerů.

Vlastnosti samotných kyselin nebo jejich derivátů jsou založeny na délce jejich řetězce, počtu karboxylových skupin, povaze a množství substituentů. Funkční deriváty mohou mít výrazně odlišné vlastnosti než jejich příslušné kyseliny, u substitučních derivátů bývají vlastnosti do jisté míry zachovány [2].

1.1.1 Acidita

Acidita neboli síla kyselin bývá vyjadřována pomocí disociační konstanty K_a . Kyselost u karboxylových kyselin vysvětluje elektronová teorie karboxylové skupiny, která působí na disociaci. Karboxylové kyseliny ve vodném roztoku disociují dle rovnice:



Disociační konstanty závisí na teplotě a druhu rozpouštědla. Obzvláště vysoké bývají disociační konstanty kyselin ve vodě. Podle uvedené rovnice můžeme disociační konstantu vyjádřit jako:

$$K_a = \frac{[RCOO^{(-)}] \cdot [H_3O^{(+)}]}{[RCOOH]}$$

Hranaté závorky ve vzorci vyjadřují molární koncentraci dané složky. Disociační konstanty monokarboxylových kyselin se obvykle pohybují v řádech 10^{-4} až 10^{-5} . Pro praktické využití se používá vyjádření přes záporný dekadický logaritmus, jako hodnota pK_a .

$$pK_a = -\log K_a$$

Takto vyjádřené hodnoty pK_a se u monokarboxylových kyselin pohybují v rozmezí 4 – 5. Čím je hodnota pK_a nižší, tím je kyselina silnější.

Přítomnost elektronegativní skupiny zvyšuje aciditu karboxylových kyselin. Z tohoto důvodu jsou halogenkyseliny, hydroxykyseliny a ketokyseliny silnější než jejich nesubstituované karboxykyseliny [3].

1.1.2 Fyzikální vlastnosti

- **Teplota varu, tání** – nižší alifatické monokarboxylové kyseliny jsou kapalné, vyšší obvykle tuhé látky. Polykarboxylové alifatické kyseliny jsou pevné látky, podobně jako aromatické kyseliny mono- i polykarboxylové. U monokarboxylových kyselin stoupá s rostoucí relativní molekulovou hmotností také teplota varu.
- **Optická aktivita** – schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla vykazuje řada hydroxykyselin, včetně kyselin jablečné a vinné. Optická aktivita je dána přítomností chirálního uhlíku. Pravotočivá forma se označuje (+), levotočivá (-). Označení izomerů D nebo L závisí čistě na prostorové konfiguraci molekuly. Tato konfigurace se označuje podle atomu uhlíku s nejvyšším pořadovým číslem (nejvzdálenějším

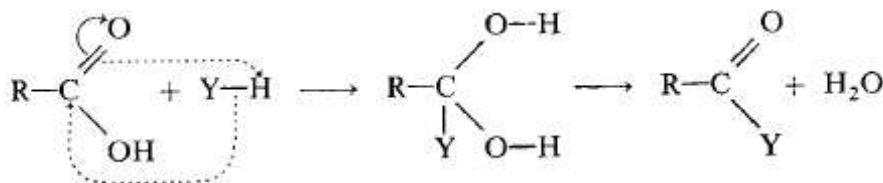
od karbonylové skupiny). Příslušnost k D či L formě nemá žádný vztah ke směru optické rotace. Jestliže je v roztoku stejné látkové množství izomerů D i L, hovoříme o tzv. racemické směsi. Tato směs nemá žádnou optickou aktivitu.

V přírodních zdrojích je obvykle pouze jedna forma konfigurace, která je fyziologicky významná [3] [4].

1.1.3 Reakce organických kyselin

Organické kyseliny podléhají řadě reakcí. Reakce mohou probíhat buď na karboxylové skupině (štěpení vazby kyslík – vodík na hydroxyly, štěpení vazby na karbonylové skupině, odštěpení celé karboxylové skupiny) nebo na uhlovodíkovém zbytku.

- **Vznik solí** – karboxylové kyseliny mohou vytvářet nejrůznější soli, nejčastěji po reakci s hydroxidy nebo uhličitany kovů. Soli jsou většinou dobře rozpustné ve vodě a silně hydrolyzovány. Dikarboxylové kyseliny mohou tvořit dvě řady solí.
- **Reakce na karbonylové skupině** – jedná se o adičně-eliminální mechanismus, kdy dochází k adici nukleofilního činidla na uhlík v karbonylu. Takto vzniká řada funkčních derivátů karboxylových kyselin.



Obr. č. 1 - Reakce na karbonylové skupině

Na karboxylu může probíhat také redukce za pomoci tetrahydridohlinitanu sodného, kdy se karboxylová kyselina redukuje na primární alkoholy. Tyto redukční reakce probíhají obtížně.

- **Dekarboxylace** – znamená rozklad kyseliny za vzniku CO_2 . Ne všechny karboxylové kyseliny podléhají dekarboxylaci snadno, některé vůbec.
- **Reakce na uhlovodíkovém zbytku** – můžeme zde zařadit reakce alifatických kyselin s halogeny nebo v případě aromatických karboxylových kyselin se jedná o elektrofilní substituce [3].

1.2 Organické kyseliny v potravinách

V potravinách se může vyskytovat široké spektrum organických kyselin. Tyto kyseliny mohou být přirozeného původu, mohou vznikat či být přidávány v průběhu zpracování potravin nebo jsou přítomny jako důsledek kažení potravin. Některé organické kyseliny, často ve formě anionů, jsou významnou součástí metabolických drah [5].

Organické kyseliny, běžně se vyskytující jako složka potravinových materiálů, mohou být slabé až středně silné, často jedno- nebo vícesytné alifatické, zřídka aromatické kyseliny. Mohou být zastoupeny ve formě volných kyselin, jejich solí nebo vázané s jinými sloučeninami (např. s alkoholy) [6].

I v nízkých koncentracích mají vliv na organoleptické a technologické vlastnosti výrobku, na hodnotu pH potravin, čímž ovlivňují také průběh chemických reakcí a údržnost potravin. Potravinou většinou obsahují řadu látek, které reagují mírně kyselé i zásaditě. Díky tomu mohou mít potraviny jistou pufrací kapacitu.

Jak aditivní látky mají organické kyseliny v potravinářském průmyslu široké využití. Mohou být použity jako konzervanty, acidulanty a regulátory kyselosti, antioxidanty, látky pro zvýraznění chuti, sekvestranty, stabilizátory barvy, látky modifikující texturu, látky potlačující tvorbu zákalů [7].

Volba dané organické kyseliny jako aditiva se odvíjí od jejího konečného vlivu na technologické i organoleptické vlastnosti výrobku. Např. při výrobě nápojů se pro úpravu chuti používá kyselina citronová pro nápoje citrusového typu, kyselina vinná je vhodná pro hroznové šťávy a kyselina jablečná v jablečných šťávách. Při volbě přidávaných kyselin je nutné přihlížet také na přítomnost vápenatých nebo hořečnatých solí, které mohou být příčinou zákalů. Proto jsou častěji kyseliny přidávány ve formě jejich solí [5].

1.2.1 Acidulanty

Acidulanty používané jako aditiva mohou být organické i anorganické kyseliny většinou identické s těmi, které se v potravinách přirozeně vyskytují [7].

Jako nositelé kyselé chuti se mohou uplatňovat tyto kyseliny: kyselina jablečná, citronová, vinná, octová, mléčná, L-askorbová, isocitronová, šťavelová a některé další.

Kyselá chuť se připisuje vodíkovému iontu a jako horní mez pro vnímání kyselé chuti se uvádí pH 6,3. Pro kyselou chuť je rozhodující celková koncentrace kyseliny, její

disociační konstanta a pH. Největší okyselovací účinek z hlediska chuti vykazuje z organických kyselin kyselina citronová, následuje kyselina vinná a kyselina mléčná. V nápojovém průmyslu se běžně používají také kyselina jablečná a fosforečná. Kombinací těchto kyselin je možné upravit tvrdost či měkkost chuti u jednotlivých druhů limonád [8].

Často bývá kyselá chuť modifikována přítomností sacharidů, tříslovin, etanolu nebo různých kationtů a jiných látek. Sacharidy chuťové účinky kyselin zeslabují, třísloviny a etanol naopak zesilují [9].

1.2.2 Konzervanty

Slabé organické kyseliny patří mezi nejběžnější konzervační látky. Molekuly těchto kyselin inhibují růst buněk bakterií, plísní i některých kvasinek. Tyto konzervační látky mají optimální inhibiční efekt při nízkých hodnotách pH potravin, které podporují nedisociovaný stav molekuly. Nedisociovaná molekula je volně permeabilní přes plazmatickou membránu a je schopna vstupu do buňky. Následně při vyšším pH uvnitř buňky molekula disociuje, což má za následek uvolnění nabitých aniontů a protonů, které nemohou projít přes plazmatickou membránu [10].

Pomineme-li organické kyseliny, které se používají především jako konzervanty (např. kyselina benzoová, sorbová...), můžeme seřadit nejběžnější organické kyseliny podle schopnosti potlačit běžnou acidofilní mikroflóru následovně: kyselina octová → kyselina mléčná → kyselina citronová → kyselina vinná a jablečná.

Při konzervaci organickými kyselinami je možné využívat synergetického působení řady látek např. spolupůsobení kyseliny octové a mléčné nebo přídavky NaCl.

Většina bakterií, zejména sporulující hnilobné bakterie a klostridia, nesnáší pH nižší než 4,0 až 4,3. Teprve až velmi silné okyselení by zastavilo také rozvoj plísní, kvasinek nebo acidofilních bakterií. Organické kyseliny mohou být také využívány některými mikroorganismy nebo podléhat oxidaci. Z běžných kyselin v ovoci se nejsnadněji oxiduje kyselina jablečná, hůře citronová a nejhůře kyselina vinná [11].

1.3 Vyjadřování kyselosti v potravinách

Stanovení kyselosti potravin je základní jakostní znak potravin, kterým lze kontrolovat technologie výroby jednotlivých produktů. Organické kyseliny se uplatňují jako důležité

senzorické a dietetické složky potravin. Významné jsou také z technologického hlediska jako bakteriostatické látky. Zjištění obsahu organických kyselin se využívá také ke kontrole správnosti skladování hotových výrobků nebo surovin. Zvýšená kyselost upozorňuje na zhoršení podmínek při skladování, které umožnily rozklad sacharidů a vznik organických kyselin. V některých druzích potravin je obsah kyselin důležitým kritériem jakosti a často je předepsán, např. obsah volných mastných kyselin v tuku, těkavých kyselin ve vínech, některých konzervářských produktech a podobně. Zvýšení kyselosti může být také technologicky žádoucí a je využíváno v řadě technologií (např. výroba kysaných mléčných výrobků, fermentované zeleniny...) [6] [12].

Pro vyjadřování kyselosti potravin se využívají dva způsoby: titrační kyselost a aktivní kyselost (pH). Mezi těmito jednotkami není žádný přímý vztah pro přepočítání a musí být stanovovány experimentálně [13].

1.3.1 Titrační kyselost

Je dána spotřebou alkalického odměrného roztoku při neutralizaci všech titrovatelných kyselin ve vzorku na předepsaný indikátor. Bod ekvivalence je možné sledovat vizuálně na vhodný indikátor nebo potenciometricky. Titrační kyselost se vyjadřuje u různých potravin odlišným způsobem. U nás a ve většině evropských zemí se pro mléčné výrobky používá vyjádření v hodnotách podle Soxhlet-Henkela (SH), v některých zemích podle Thörnera (T). U jiných potravin může být titrační kyselost vyjadřována jako % nebo g převládající organické kyseliny v určitém množství vzorku.

Hodnoty podle Soxhlet-Henkela udávají počet ml odměrného roztoku NaOH o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ potřebných pro neutralizaci 100 ml případně 100 g vzorku (mléko, mléčné výrobky) na indikátor fenolftalein, za podmínek metody.

Hodnoty podle Thörnera (T) vyjadřují spotřebu odměrného roztoku NaOH o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na neutralizaci 100 ml (100 g) mléka či mléčných výrobků na indikátor fenolftalein za podmínek metody.

U ovocných polotovarů a výrobků z ovoce a zeleniny se titrační kyselost vyjadřuje jako % nebo g organických kyselin na 100 ml vzorku, u vína jako g kyseliny vinné na 1 l vzorku, u lihovin jako mg kyseliny octové na 100 ml vzorku. U ovoce a kompotů může být titrační kyselost vyjadřována také jako hmot.% kyseliny citronové, u zeleniny

a výrobků z nich jako hmot.% kyseliny octové. Titrační kyselost bývá také určována u tuků a olejů, u piva, kvasného octa, medu i mlýnských výrobků [6].

Podle Handbook of Food Analytical Chemistry (Příručka analytické chemie potravin) jsou standardní kyseliny pro některé potraviny následující:

- kyselina jablečná - jablka, meruňky, banány, třešně, broskve, hrušky, švestky,
- kyselina vinná - hroznové víno,
- kyselina citronová - standardní pro borůvky, brusinky, grepy, citrony, limety, pomeranče, ananasy, maliny, jahody a rajská jablka [13].

1.3.2 Aktivní kyselost

U potravinářských surovin, polotovarů a výrobků představuje hodnota pH velmi důležité kritérium pro posouzení údržnosti i pro sensorické posouzení. Hodnota pH se vypočte jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů. Ve vodných zředěných roztocích je možné aktivitu nahradit koncentrací oxoniových kationtů. Obecně platí rovnice:

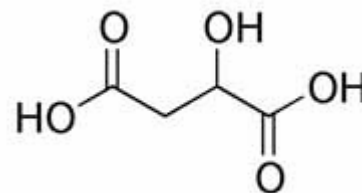
$$pH = -\log (a(H_3O^+))$$

Metody pro měření pH jsou založeny buď na elektrometrickém nebo kolorimetrickém (indikační papírky) principu. Měření pH znamená v podstatě měření změn potenciálu mezi dvěma elektrodami: měřící (indikační) a srovnávací (referenční). Na rozhraní pevné a kapalné fáze se vyskytuje tzv. fázový potenciál, kde platí Nernstova rovnice, která udává vztah mezi potenciálem elektrody a koncentrací iontů určujících potenciál. Potenciál se určuje vždy relativně vůči jiné elektrodě. Pro měření pH využíváme pH-metr se skleněnou, kalomelovou, chlorstříbrnou nebo kombinovanou elektrodou [6] [12].

Velmi důležitým technologickým kritériem je pH suroviny či potraviny. Potraviny s hodnotou pH pod 4 označujeme jako technologicky kyselé, s hodnotou pH mezi 4 – 6,5 jako technologicky málo kyselé a potraviny s pH nad 6,5 technologicky nekyselé.

1.4 Kyselina jablečná

Patří do skupiny α -hydroxy organických kyselin se systematickým názvem 2-hydroxybutandiová kyselina. Poprvé byla izolována z jablečného moštu v roce 1785 švédským chemikem německého původu Carlem Wilhelm Scheelem. Roku 1787 navrhl Antoine Lavoisier název *acide malique*, což je odvozeno z latinského výrazu pro jablko *malum*.



1.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Kyselina jablečná je pevná krystalická látka ve vodě dobře rozpustná. Disociační konstanta $pK_{a1} = 3,4$ a $pK_{a2} = 5,13$. Je méně hygroskopická než kyselina citronová, což zlepšuje skladovatelnost i dobu použitelnosti. Na rozdíl od kyseliny vinné jsou její vápenaté a hořečnaté soli dobře rozpustné, díky čemuž nenastávají problémy při použití tvrdší vody (zejména v průmyslu výroby nápojů) [14] [15].

Molekula kyseliny jablečné je opticky aktivní a může tvořit dvě opticky aktivní formy. Přirozeně se vyskytuje pouze v L-formě. Ve formě malátu je součástí biochemických reakcí, zejména citrátového cyklu [5].

1.4.2 Výskyt v přírodě a výroba

Jak triviální název napovídá, je blízce spojená s jablky a je v přírodě široce rozšířená. Je druhou majoritní kyselinou v citrusových plodech a hojně se nachází také v bobulovém ovoci. Při vnímání kyselé chuti je kyselina jablečná lehce silnější (ostřejší) než kyselina citronová, zároveň uděluje potravině plnější ovocnou chuť [15].

Kyselina jablečná spolu s kyselinou vinnou je jedna z hlavních kyselin ve vinných hroznech. Obsah kyseliny jablečné ve šťávě z hroznů je maximální těsně před zráním, kdy může dosahovat koncentrace až 20 g.dm^{-3} . Během zrání obsah kyseliny jablečné klesá a při sklizni bývá obsah kolem $1 - 9 \text{ g.dm}^{-3}$. Tyto ztráty zapříčiněné respirací jsou výraznější v teplém klimatu [16].

V přírodě se vyskytující L-kyselina jablečná může být připravena izolací z přírodních ovocných džusů nebo separací z racemických směsí produkovaných synteticky. Průmyslově je připravována enzymaticky z kyseliny fumarové pomocí enzymu *fumarázy*.

Pro tento účel jsou využívány mikrobiální buňky, které produkují tento enzym [17]. Dle Velíška [2] se průmyslově vyrábí za pomoci bakterií *Lactobacillus brevis* nebo kvasinek rodu *Candida*. Pro produkci kyseliny jablečné byly také zkoumány další druhy mikroorganismů např. *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium ammoniagenses* (dříve *Brevibacterium ammoniagenses*) [18], *Saccharomyces cerevisiae* [19] [20].

Tab.č. 1: Obsah kyseliny jablečné v různých druzích ovoce a zeleniny [21]

| Druh ovoce, zeleniny | Průměrný celkový obsah organických kyselin [g.100 g ⁻¹] | Průměrný obsah kyseliny jablečné [g.100 g ⁻¹] |
|----------------------|---|---|
| Angrešt | 2,90 – 0,90 | 2,08 – 0,40 |
| Borůvky | 2,00 – 0,45 | 0,85 – 0,14 |
| Hrozný | 2,50 – 0,23 | 2,10 – 0,06 |
| Jablka | 2,00 – 0,10 | 0,79 – 0,27 |
| Jeřabiny | 3,80 – 0,60 | 3,10 – 1,60 |
| Meruňky | 2,60 – 0,20 | 1,30 – 0,31 |
| Šípky | 3,80 – 0,95 | 3,34 – 3,14 |
| Švestky | 3,90 – 0,39 | 2,90 – 0,29 |
| Višně | 2,46 – 0,80 | 1,46 – 1,43 |
| Cibule | 0,39 – 0,10 | 0,23 – 0,09 |
| Celer bulvový | 0,29 – 0,10 | 0,17 – 0,05 |
| Okurky | 0,23 – 0,03 | 0,24 |
| Paprika zeleninová | 0,22 – 0,08 | 0,06 – 0,02 |
| Rajčata | 1,22 – 0,15 | 0,28 – 0,02 |

1.4.3 Využití v potravinářském průmyslu

V mezinárodním seznamu přídatných látek, kde je označena kódem E 296 (DL-kyselina jablečná), je využívána jako regulátor kyselosti a ochucující látka. Nejvyšší povolené množství činí 3000 mg.l^{-1} pro ananasovou šťávu. Dále se smí přidávat při výrobě džemů, rosolů a podobných výrobků z ovoce, při výrobě balených nezpracovaných loupáných brambor a sterilovaného ovoce a zeleniny jak v plechovkách, tak i ve sklenicích [22].

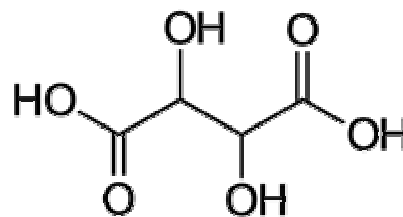
Kyselina jablečná může být také použita k zamaskování nežádoucích příchutí některých umělých sladidel. V kombinaci s kyselinou citronovou mívá lepší chuťové charakteristiky než při použití těchto kyselin samostatně.

Kyselinu jablečnou můžeme nalézt v řadě produktů, obzvláště v sycených i nesycených nápojích s ovocnou příchutí. Je preferovaným acidulantem u nízkokalorických nápojů a jablečné šťávy, kde podporuje chuť a stabilitu barviv [15].

Ve vinařství bývá využívána tzv. jablečno-mléčná fermentace pro snížení obsahu kyseliny jablečné ve víně. Vytvořená kyselina mléčná má jemnější chuť a dodává vínu kulatější a plnější chuť. Jablečno-mléčné kvašení se využívá zejména při výrobě červených vín, v malé míře u vín bílých. Fermentace je způsobena bakteriemi mléčného kvašení např. *Oenococcus oeni* (dříve *Leuconostoc oenos*) [20]. Chemicky se jedná o dekarboxylaci kyseliny jablečné za vzniku kyseliny mléčné a oxidu uhličitého [23].

1.5 Kyselina vinná

Je organická kyselina se systematickým názvem 2,3-dihydroxybutandiová kyselina. Je důležitým zástupcem hydroxydikarboxylových kyselin. Poprvé byla izolována kolem roku 800 perským alchymistou Jabir ibn Hayyanem z vínanu draselného. Moderní proces výroby vypracoval Carl Wilhelm Scheele roku 1769. Roku 1832 Jean Baptiste Biot objevil chiralitu molekuly kyseliny vinné, v dalších výzkumech s krystaly kyseliny vinné pokračoval Luis Pasteur, který zjistil jejich asymetričnost [24].



1.5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Čistá L-(+)-kyselina vinná je bezbarvá či bílá krystalická látka, ve vodě dobře rozpustná. Disociační konstanty jsou $pK_{a1} = 2,96$ a $pK_{a2} = 4,16$. Hydrogendraselná sůl kyseliny vinné je špatně rozpustná a vylučuje se ve formě krystalů během kvašení vína jako tzv. vinný kámen. Rozpustnost vinného kamene závisí na teplotě, obsahu alkoholu, iontů K^+ i obsahu kyseliny vinné. Od kyseliny vinné je odvozena Seignettova sůl neboli vinnan sodno-draselný, který je součástí Fehlingova činidla sloužícího k důkazu redukujících sacharidů [7] [8] [25].

Molekula kyseliny vinné má dva asymetrické uhlíkové atomy, ale neexistuje ve čtyřech prostorových izomerech, jak by se mohlo zdát s ohledem na dvě aktivní centra. Známý jsou tři izomery - dva enantiomery a mesoforma [26].

V přírodě se vyskytuje prakticky výhradně jako L-(+)-vinná kyselina, ojediněle také ve formě D(-). *Meso*-vinná kyselina se v přírodě nevyskytuje a jedná se o opticky inaktivní formu. Racemická směs obou izomerů D a L, známá jako kyselina hroznová, byla prokázána ve šťávě z hroznů [9].

1.5.2 Výskyt v přírodě a výroba

Kyselina vinná je v přirozené formě součástí mnoha druhů ovoce, obzvláště v hroznovém víně, některých drobných bobulích (červený rybíz, angrešt, brusinky...) nebo v málo známém tamaryšku, někdy označovaném jako kyselé nebo indické datle. Naopak kyselinu vinnou nenajdeme v jablkách, borůvkách nebo černém rybízu [11] [24].

Koncentrace kyseliny vinné ve vinných hroznech se značně liší, závisí na odrůdě révy a půdě. Během doby květu se ukládá velké množství kyseliny v květech a následně v mladých bobulích. Během zrání hroznů zůstává obsah kyseliny relativně stálý, protože na rozdíl od kyseliny jablečné není kyselina vinná metabolizována respirací v rostlinných materiálech [16].

Průmyslově se kyselina vinná získává extrakcí z vinného kamene (hydrogenvinnan draselný). Racemická směs DL-vinné kyseliny může být získávána chemickou syntézou z anhydridu kyseliny maleinové [27].

Pomocí různých biotechnologií je možné získávat kyselinu L(+)-vinnou, kde se využívá konverze *cis*-epoxysukcinátu vápenatého pomocí bakterií (např. *Acinetobacter*

tartarogenes, *Agrobacterium aurem* [28], *Nocardica tartaricans* [29] a mnoho dalších). Další z možností jak získávat kyselinu D(-)-vinnou je opět pomocí mikroorganismů, které jsou schopné asimilovat pouze kyselinu v konfiguraci L(+) ze substrátu obsahujícího DL-vinnou kyselinu. [30]

Tab.č. 2: Obsah kyseliny vinné v různých druzích ovoce a zeleniny [21]

| Druh ovoce, zeleniny | Průměrný celkový obsah organických kyselin [g.100 g ⁻¹] | Průměrný obsah kyseliny vinné [g.100 g ⁻¹] |
|----------------------|--|---|
| Angrešt | 2,90 – 0,90 | 0,41 – 0,04 |
| Brusinky | 3,10 – 1,40 | 0,07 – 0,06 |
| Hrozny | 2,50 – 0,230 | 2,11 – 0,19 |
| Mango | - | 0,08 |
| Rybíz červený | 3,68 – 1,20 | 0,08 – 0,04 |
| Švestky | 3,90 – 0,39 | 0,02 |
| Celer bulvový | 0,29 – 0,10 | 0,02 |
| Lilek (baklažán) | 0,40 – 0,09 | 0,12 |
| Paprika zeleninová | 0,22 – 0,08 | 0,05 |
| Pastinák | 0,17 | 0,03 |
| Petržel | 0,28 – 0,12 | 0,02 |

1.5.3 Využití v potravinářském průmyslu

V mezinárodním seznamu přídatných látek je označena kódem E 334 jako L(+) kyselina vinná. Dle vyhlášky 4/2008 Sb. je její použití povoleno pro kakaový prášek, čokoládu a výrobky z čokolády v nejvyšším povoleném množství 5000 mg.kg⁻¹. Dále se smí používat pro výrobu džemů, rosolů, marmelád a podobných výrobků z ovoce, sterilovaného ovoce a zeleniny. Její použití je také dovoleno u sušenek a sucharů určené kojencům a malým dětem v nevyšším povoleném množství 5000 mg.kg⁻¹ [22].

V potravinářském průmyslu je používána předně jako acidulant, vykazuje také jisté antioxidační vlastnosti a synergeticky působí s některými jinými antioxidanty. Je schopná vytvářet chemické komplexy s ionty kovů a může být použita jako sekvestrant.

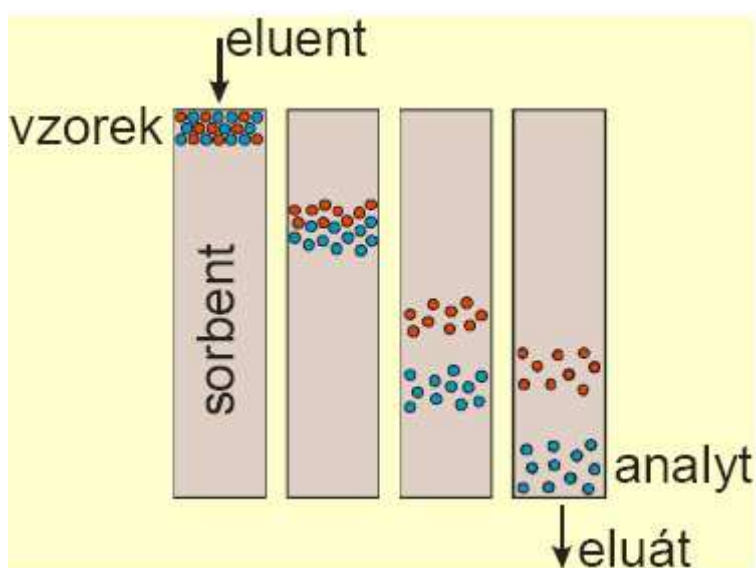
Jako acidulant nejčastěji vystupuje v nápojích, cukrovinkách, džemech a ovocných pomazánkách a džusech, upravuje pH při výrobě vína. Kyselina vinná je přírodní sloučenina poskytující charakteristickou kyselou a ovocnou chuť [31].



Obr. č. 2 - Kyselina vinná získaná přímo z vinného moštu - nečištěná a komerčně vyráběná kyselina vinná

2 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda, kde se molekuly analytu během separace rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být ve stacionární fázi zachycovány či unášeny mobilní fází. Tím se postupně jednotlivé složky od sebe separují. Chromatografie je současně jak separační, tak i analytická metoda, která poskytuje kvalitativní i kvantitativní analýzu [32] [33].



Obr. č. 3 - Schéma separace na koloně

2.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je celá řada a je účelné rozdělit je do skupin. Vzhledem k značné různorodosti ji můžeme rozdělit podle různých hledisek: podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze, podle povahy děje, který převládá při separaci, podle podmínek, podle účelu nebo pracovního provedení.

- **podle skupenství mobilní fáze**
 - kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography – LC),
 - plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC).

- **podle uspořádání stacionární fáze**
 - kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v trubici,
 - plošné techniky:
 - papírová chromatografie (Paper Chromatography – PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru,
 - tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography –TLC) stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (skleněná deska, hliníková fólie).
- **podle povahy děje převládajícího při separaci**
 - rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi,
 - adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná schopnost složek poutat se (adsorbovat) na povrch stacionární fáze,
 - iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty ve vzorku,
 - gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu), menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt),
 - afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) [33].
- **podle podmínek**
 - izokratická chromatografie – prováděna za konstantních podmínek (např. složení mobilní fáze, teplota...),
 - gradientová chromatografie – během separace se podmínky mění [32].

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC

Vysokoučinná nebo také vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance (Pressure) Liquid Chromatography) je typem kolonové chromatografie, která je používána asi od konce šedesátých let 20. století. Nejprve se používala klasická kapalinová chromatografie především pro rozdělování směsí látek. Zde byl proces dělení velmi pomalý, průtok mobilní fáze byl zajištěn pouze gravitační silou [34].

Výrazného zrychlení procesu dělení bylo dosaženo použitím dostatečně malých částic v náplni kolony, vysokotlakých bezpulzních čerpadel a odolných aparatur. Zapojením univerzálních nebo selektivních detektorů může být dosaženo vysoké přesnosti metody.

Na vývoji HPLC se v letech 1970 – 1979 výrazně podíleli: Csaba Horvát, Istvan Halasz, Joseph (Jack) Kirkland, Fred E. Reginer a mnoho dalších.

Všechny formy chromatografických metod je možné popsat jako diferencovaný migrační proces, ve kterém jsou molekuly jednotlivých složek vzorku selektivně zpomalovány stacionární fází.

Společným ukazatelem je několik základních rysů:

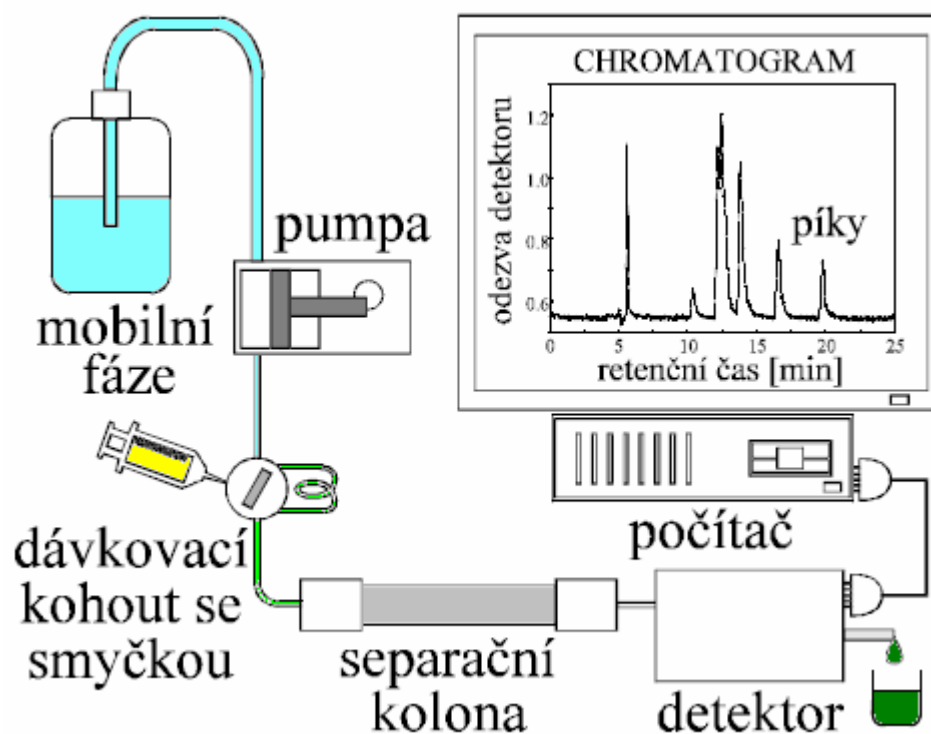
- existence fázového rozhraní mezi stacionární fází a eluentem, který unáší vzorek tak, aby obtékal stacionární fází,
- při obtékání stacionární fáze mobilní fází, dochází k mnohonásobné interakci molekul separované látky s oběma fázemi [35].

Jako hlavní separační procesy se u kapalinové chromatografie uplatňují především adsorpce, rozdělování mezi dvě nemísitelné fáze (s normální nebo obrácenou fází), výměna iontů, mechanické dělení molekul v pórech gelu nebo bioafinita. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou, případně papírovou kapalinovou chromatografii [33].

Stanovení pomocí HPLC má několik výhod: vysokou rozlišovací schopnost, rychlost (pro rozdělení většinou postačí méně než 1 hodina), vysokou citlivost a možnost automatizace. Nevýhodou je především vysoká cena přístroje a malá kapacita, která znemožňuje použití metody pro purifikaci většího množství látek. Řešení nabízí použití preparativních HPLC kolon [36].

2.2.1 Součásti aparatury HPLC

K účinné separaci je nutné použít dostatečně malých zrníček sorbentu, které kladou při průchodu mobilní fáze značný odpor. Tento odpor je překonán vnějším tlakem pomocí čerpadla [33]. Mobilní fáze je ze zásobníku čerpána pod tlakem a prochází dávkovacím kohoutem (smyčkou), pomocí které je nastříknut vzorek. Směs mobilní fáze se vzorkem je hnána přes separační kolonu, kde dochází k rozdělení složek směsi, za přispění různých mechanismů. Obvykle jeden z mechanismů převládá. Na výstupu z kolony je separovaná složka vedena na účinný detektor. Pomocí připojeného počítače je výstupní odezva detektoru zaznamenána ve formě chromatogramu. Stabilní, případně měnící teplota při separaci, je zajištěna termostatem. V některých případech je nutné zapojit také zařízení pro deaeraci mobilní fáze, poměrně běžné je zapojení ochranných předkolon do systému.

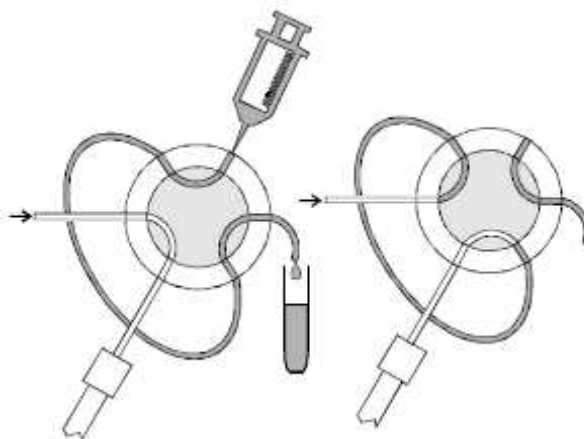


Obr. č. 4 - Schéma kapalinového chromatografu HPLC [37]

- **čerpadlo (pumpa)** – z funkčního hlediska můžeme čerpadla rozdělit na pneumatická, pulzující s membránou nebo bez membrány a pumpy s lineárním posunem pístu. Každé z těchto čerpadel má své výhody a nevýhody. Důležité je zajistit dostatečně velký tlak pro separaci, stabilitu a bezpulznost průtoku mobilní fáze, případně umožnit programové změny ve složení mobilní fáze [35]. Dobré čerpadlo dosahuje průtoku

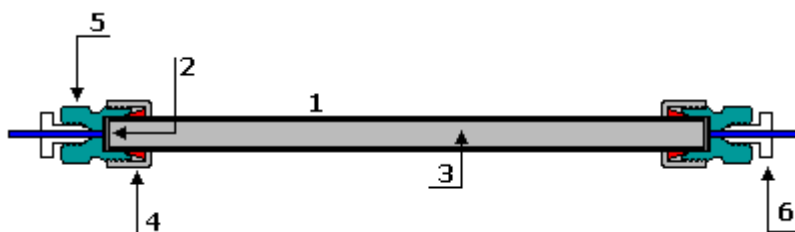
v rozsahu mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu. Důležité je, aby tlak nekolísal více než o 1 % a obstálo při tlaku nad 35 MPa.

- **dávkovací ventil** – většinou je řešen jako šesticestný (i sedmicestný) obtokový dávkovací kohout, kde dávkovací smyčka má objem 10 až 100 μl [38].



Obr. č. 5 – Dávkovací ventil

- **kolona** - jedná se v podstatě o trubku (případně kapiláru), která je rovnoměrně naplněná stacionární fází. Kolona je obalena pláštěm (1) z inertního materiálu, který je odolný vůči vysokým tlakům a je dostatečně hladký. Většinou se jedná o nerezovou ocel, plast nebo sklo. Plášť je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) a zároveň umožňuje průtok mobilní fáze. Konce kolony jsou obaleny ochranným převlečným kroužkem (4) a kovovou hlavicí (5), ve které je vstup pro kapiláru se šroubem (6) [39].



Obr. č. 6 - Schéma chromatografické kolony [39]

Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (většinou 5 - 25 cm). Vnitřní průměr kolon je 4,6 nebo 5 mm. Částice stacionární fáze mají průměr 1,5 – 10 μm .

Stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii mohou být anorganické, organické nebo smíšené materiály.

Podle použití můžeme stacionární fáze rozdělit na:

- adsorbenty – pro adsorpční kapalinovou chromatografii (Liquid Solid Chromatography - LSC),
 - nosiče – pro rozdělovací chromatografii (Liquid Liquid Chromatography - LLC),
 - gely – pro gelovou permeační chromatografii (Gel Permeation Chromatography - GPC),
 - ionexy – pro ionexovou chromatografii (Ion Exchange Chromatography – IEC) [35].
- **detektor** – zařízení, které vhodným snímačem sleduje jednu nebo několik vlastností eluátu a převádí jejich změny na elektrické signály. Detektory pro HPLC by měly být selektivní pro analýzy a málo citlivé na mobilní fázi [35]. Detektorů použitelných pro HPLC je celá řada, např. spektrofotometrický (UV/VIS), fluorescenční (FLD), elektrochemický (ECD), refraktometrický (RI), infračervený (IR), hmotnostní (MS) atd.

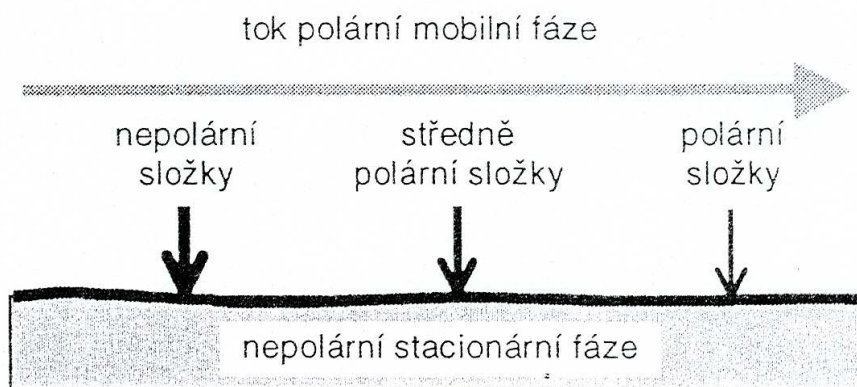
Tab.č. 3: Vlastnosti některých detektorů

| Detektor | Typ detektoru | Odezva | Měřená veličina | Typická citlivost | Gradientová eluce |
|----------|----------------|-------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| RI | nedestruktivní | univerzální | index lomu | μg | ne |
| UV-VIS | nedestruktivní | selektivní | absorbance | ng | ano |
| IR | nedestruktivní | selektivní | absorbance | μg | ne |
| ECD | destruktivní | selektivní | elektrický proud | pg | ne |
| FLD | nedestruktivní | selektivní | intenzita fluorescence | pg | ano |

2.2.2 Kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC)

Je typem kapalinové chromatografie, kde k separaci dochází na nepolární stacionární fázi a mobilní fáze je polární. Označení „reverzní fáze“ má historický podklad. V letech 1970 se většinou používaly jako náplně kolon částice na bázi silikagelu nebo oxidu hlinitého, které mají hydrofilní povrch a tím vyšší afinitu pro polární částice. Tyto fáze získaly označení „normální“ [40].

V rozdělovací kapalinové chromatografii se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Stacionární fáze je ve formě filmu zakotvena na pevném nosiči. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity [33].



Obr. č. 7 - Schéma RP-HPLC

Stacionární fáze může být zakotvená na nosiči fyzikálně nebo chemicky. Fyzikálně zakotvená stacionární fáze se postupně eluentem vymývá z kolony a proto se více využívají chemicky vázané fáze [35]. Chemicky vázaná fáze je odolnější ke změnám teploty i složení mobilní fáze. Nosičem je nejčastěji silikagel případně sklo ve formě definovaných kuliček. Póry prostupují buď celý objem kuličky nosiče nebo mohou být jen povrchové [33].

Potřeba separací při vyšším pH vedla postupně k vytvoření alternativních kolon, kde nosičem jsou oxidy kovů, např. oxidu titaničitého, hlinitého a nejčastěji zirkoničitého. V nemodifikované podobě se může oxid zirkoničitý využívat pro HPLC s normální fází. Povrch oxidu zirkoničitého může být také upraven pro separace s reverzní fází, a to pomocí tenké vrstvy polybutadienu, polystyrenu nebo pyrolyticky vyloučeného uhlíku s navázaným ligandem C18 [41] [42].

Pro zakotvení fází se využívá několik typů chemických reakcí. Vazby vytvořené esterifikací (-Si-O-C) nejsou stabilní vůči hydrolyze a tyto náplně mají omezené použití – v mobilní fázi nesmí být přítomna voda. Vůči hydrolyze jsou odolnější vazby typu (-Si-N-C) a zcela odolné proti hydrolyze jsou vazby typu (-Si-O-Si-C). Vznikají reakcí (tzv. silanizace) silanolových skupin s trialkylchlorsilany, dialkyldichlorsilany nebo alkyltrichlorsilany.



Obr. č. 8 - Reakce chemického zakotvení stacionární fáze [41]

Jako nepolární zakotvená fáze nejčastěji slouží alkyly jako oktadecyl (C18) a oktyl (C8), dále také fenyl nebo alkylfenyl [33] [41].

Složení mobilní fáze má vliv na: účinnost kolony, kapacitní poměr (faktor), retenční poměr, rozlišení, dobu analýzy a citlivost. Hlavními rozpouštědly v RP-HPLC jsou voda, metanol, tetrahydrofuran, acetonitril a pufr.

Volba mobilní fáze a její pH závisí na použité stacionární fázi. V RP-HPLC závisí retence jednosytné kyseliny na pH a disociační konstantě K_a . Pro látky iontové povahy můžeme jejich chromatografické chování ovlivnit volbou pH mobilní fáze, kdy změnou pH dochází k potlačení disociace slabých kyselin. Pro organické kyseliny dochází k potlačení disociace snížením pH na hodnoty 2 až 5. Mobilní fáze pro RP-HPLC jsou často vodné roztoky pufrů v kombinaci s organickými složkami (např. metanol nebo acetonitril). Pufr by měl potlačit disociaci kyseliny a mít dostatečnou pufrací kapacitu. Hodnota pH by se měla v případě stacionárních fází na bázi silikagelu pohybovat v rozmezí 2 až 8. Důležitým kritériem je také rozpustnost pufru za přítomnosti organické složky. Dobrou rozpustnost poskytuje systém metanol a voda [43] [44].

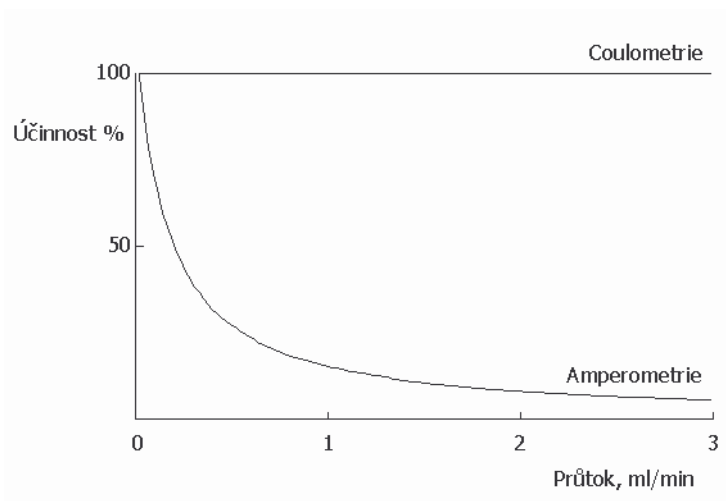
2.2.3 Elektrochemický detektor (ECD)

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektrody a mobilní fáze. Nejčastěji je využívána elektrochemická reakce redoxního systému.

Detekce dosahují vysoké citlivosti (v pg, některé zdroje udávají až fg = 10^{-15} g) a senzitivity [45]. Množství pro aplikaci elektrochemických detekcí není příliš velké. Látky na které se ECD aplikují spadají do oblasti léčiv, kontaminantů i přírodních produktů. Byly také popsány aplikace při odhalování falšování potravin. Jednou z možností rozšíření aplikací ECD je využití derivatizačních reakcí [46] [47].

Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektroodový potenciál, proud, kapacita), která je vyvolána průchodem látky průtokovou celou detektorem, ve které jsou umístěny elektrody. Na elektrodách je vloženo pracovní napětí, které je nutné pro průběh chemické reakce. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky. U elektrolytických metod se uplatňují tyto závisle proměnné veličiny: potenciál elektrody, proud, čas a koncentrace elektroaktivní látky.

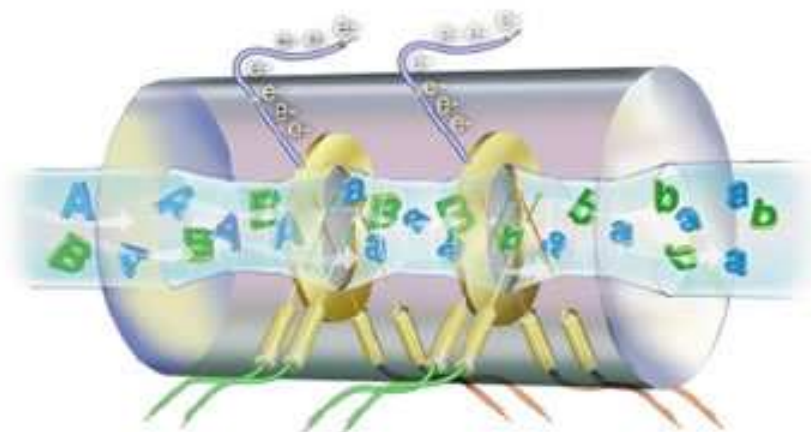
V zásadě existují dva typy elektrochemických detektorů: **amperometrický** a **coulometrický**. Amperometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky. Účinnost amperometrické elektrody závisí na ploše a znečištění elektrody a na průtoku mobilní fáze, protože se zde uplatňují difúzní jevy. U coulometrických detektorů účinnost nezávisí na průtoku.



Obr. č. 9 - Účinnost elektrochemické reakce v závislosti na průtoku mobilní fáze [47]

Principem coulometrického detektoru (např. ESA Coulochem III) je měření náboje potřebného pro oxidaci nebo redukci při konstantním napětí. Stanovovaná látka v mobilní fázi protéká měrnou celou detektorem. Účinnost elektrochemické reakce je možné zvýšit použitím elektrod tzv. fritového typu (grafitové porézní pracovní elektrody), případně

zapojením několika elektrod v sérii. Velkou výhodou coulometrie je, že účinnost elektrochemického děje se blíží 100 % a nezávisí na rychlosti průtoku mobilní fáze [35] [47].



Obr. č. 10 - Schéma coulometrické detekce [45]

Mobilní fáze musí být vodivá, díky čemuž jsou využívány systémy s reverzní fází. Při elektrochemické detekci jsou kladeny velké požadavky na mobilní fázi:

- požadavky na čistotu použitých chemikálií (voda, pufrů, nízký obsah kovů),
- odvodušnění (pro dosažení stabilní základní linie),
- vhodný výběr pufrů (fosfátové, citrátové, octanové),
- dostatečná iontová síla mobilní fáze pro dobrý přenos elektronů (lze zvýšit např. přidáním chloristanů) [48].

2.2.4 Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné pomocí HPLC

Pro stanovení kyseliny jablečné a vinné v potravinách lze v literatuře nalézt řadu možností. Může se jednat o metody elektrochemické, enzymatické, metody odměrné analýzy a především metody chromatografické (přes papírovou, tenkovrstevnou, plynovou a HPLC).

Velká část metod je založena na vysokoúčinné kapalinové chromatografii, kde byla popsána řada principů s různými mobilními fázemi, typy kolon s různými detekcemi. Některé metodiky využívají také derivatizační reakce. Jako nejčastější typ separace pro rozdělení organických kyselin byl použit systém s reverzními fázemi nebo

iontově-výměnná chromatografie. Pro přehled je uvedena tab. č. 4 s možnostmi HPLC detekce kyseliny jablečné a vinné.

Tab.č. 4: Možnosti stanovení kyseliny jablečné a vinné pomocí HPLC

| Organická kyselina | Složení mobilní fáze | Typ detekce | Typ kolony | Zdroj |
|-----------------------------------|--|-------------------------|--|-------|
| kyselina jablečná (malic acid) | H ₂ O-Met-OH-H ₃ PO ₄ | UV (210 nm) | LiChrosorb RP - 18 | [49] |
| | 0,04 mM ftalát draselný (+ hydroxid litný) | UV nebo konduktometr | Nova-pak C18 | [50] |
| | 0,25 obj. % kyselina octová | UV (254 nm) | Supelcosil C18 | [51] |
| | 0,1 mM HClO ₄ -etanol + 2-metyl-1,4-naftochinon | ECD | RSpak KC – 811 (iontová výměna) | [52] |
| | 0,02 M (NH ₄) ₂ HPO ₄ – Met-OH | UV (210 nm) | ODS – 2 (Spherisorb) | [53] |
| | 0,0085 M H ₂ SO ₄ | RI | Ion – 300 (Interchim) | [54] |
| | 0,05 M KH ₂ PO ₄ (s H ₃ PO ₄) | UV (210 nm) | YMC-ODS-AQ (C18) | [13] |
| kyselina vinná (tartaric acid) | Met-OH-H ₂ SO ₄ -H ₂ O (gradientová eluce) | DAD | Shim-Pack VP-ODS (C18) | [55] |
| | 0,01 N H ₂ SO ₄ | UV (214 nm) | Bio Rad Aminex HPX-87 (iontová výměna) | [56] |
| | 0,25 obj. % kyselina octová | UV (254 nm) | Supelcosil C18 | [51] |
| | 0,1 mM HClO ₄ -etanol + 2-metyl-1,4-naftochinon | ECD | RSpak KC – 811 (iontová výměna) | [52] |
| | 0,02 M (NH ₄) ₂ HPO ₄ - Met-OH | UV (210 nm) | ODS – 2 (Spherisorb) | [53] |
| | 0,04 mM ftalát draselný (+ hydroxid litný) | UV nebo konduktometr | Nova-pak C18 | [50] |
| | 0,0085 M H ₂ SO ₄ | RI | Ion – 300 (Interchim) | [54] |
| | 0,05 M KH ₂ PO ₄ (s H ₃ PO ₄) | UV (210 nm) | YMC-ODS-AQ (C18) | [13] |

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 METODIKA PRÁCE

3.1 Použité chemikálie

acetonitril – v čistotě pro HPLC (Lab-Scan, Polsko)

dihydrogen fosforečnan draselný (Penta, Chrudim)

hydroxid draselný a sodný pro úpravu pH (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

kyselina etylendiaminotetraoctová – EDTA (Lach-ner, Neratovice)

kyselina fosforečná (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

kyselina jablečná – inaktivní (Lachema, N.P. Brno)

kyselina octová (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

kyselina sulfanilová (Lachema, N.P. Brno)

kyselina vinná (Lachema, N.P. Brno)

metanol – v čistotě pro HPLC (99,9% , Lab-Scan, Polsko)

monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema, N.P. Brno)

trimethylamin (Merck, Německo)

redestilovaná voda

3.2 Použité přístroje a pomůcky

Aparatura HPLC – ECD: Coulochem III (ESA – 22 Alpha Road, Chelmsford, USA)

- detektor: analytická cela typ 5010 A, guard cela typ 5020
- pumpa – model 582 (ESA – 22 Alpha Road, Chelmsford, USA)
- dávkovací ventil se smyčkou o objemu smyčky 20 μ l
- kolony: AscentisTM C18 (150 \times 4,6 mm; 5 μ m; Supelco, USA)
Discovery C18 (250 \times 4,6 mm; 5 μ m; Sigma Aldrich)
- předkolona C8 (Labicom)

stolní pH metr (HANA instrument, pH 211 Microprocessor pH metr)

analytické váhy (Adam – Alfa 210 LC, Kern)

předvážky (Kern, SRN)

dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

stříkačkové mikrofiltry Nylon 0,45 μm \times 13 mm (Cronus, Labicom, Brno)

mikrofiltr pro filtraci mobilní fáze Nylon 66 membrane 0,2 μm \times 47 mm (Supelco, USA)

běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.3 Příprava mobilních fází pro analýzu

Dle dostupné literatury byly připraveny čtyři různé mobilní fáze. Složení některých mobilních fází bylo nutné upravit podle dostupnosti chemikálií.

3.3.1 Příprava mobilní fáze 1

Pro přípravu mobilní fáze 1 byly smíchány redestilovaná voda (rH_2O), metanol (Met-OH) a kyselina fosforečná (H_3PO_4) o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v poměru 69 : 1 : 30. Úprava pH proběhla pomocí roztoku hydroxidu draselného na hodnotu 2,9. Mobilní fáze byla přefiltrována pomocí filtrační aparatury s použitím nylonového mikrofiltru o velikosti pórů 0,2 μm .

3.3.2 Příprava mobilní fáze 2

Složky mobilní fáze 2 jsou stejné jako pro mobilní fázi 1, pouze v jiném poměru. Směs redestilované vody, metanolu a kyseliny fosforečné ($0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byla připravena v poměru 0,5 : 99 : 0,5. Hodnota pH byla upravena na 2,9 pomocí roztoku hydroxidu draselného. Tato upravená směs byla filtrována přes nylonový mikrofiltr s porozitou 0,2 μm .

3.3.3 Příprava mobilní fáze 3

Tato mobilní fáze je primárně určena pro stanovení biogenních aminů a kyselých metabolitů, dle technických poznámek firmy ESA [57]. V důsledku nedostupnosti některých chemikálií bylo nutné tuto mobilní fázi upravit. Pro naše potřeby byla připravena v objemu jednoho litru. Nejdříve bylo odváženo 10,35 g monohydrátu dihydrogen-fosforečnanu sodného, který byl rozpuštěn v polovičním objemu redestilované

vody. Do tohoto roztoku bylo přidáno 10,35 g kyseliny sulfanilové, 100 μl trimethylaminu a 250 μl EDTA o koncentraci 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (připravena rozpuštěním 0,731 g EDTA ve 25 ml redestilované vody, pro úplné rozpuštění EDTA je nutné přidat KOH). Následoval přídavek 100 ml acetonitrilu v HPLC čistotě. Roztok byl doplněn z větší části redestilovanou vodou, aby byla ponechána rezerva pro úpravu pH pomocí kyseliny fosforečné. Po dosažení hodnoty pH 3 byl objem mobilní fáze doplněn do jednoho litru. Výsledná mobilní fáze byla zfiltrována přes nylonový filtr s póry 0,2 μm .

3.3.4 Příprava mobilní fáze 4

Tato mobilní fáze je jednou z variant fosfátových pufrů. Jedná se o roztok dihydrogen-fosforečnanu draselného o koncentraci 0,05 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v kombinaci s kyselinou fosforečnou tak, aby pH výsledného roztoku odpovídalo hodnotě 3. Pro přípravu 500 ml mobilní fáze bylo rozpuštěno 3,4 g KH_2PO_4 v téměř celém objemu redestilované vody. Po rozpuštění bylo upraveno pH pomocí H_3PO_4 . Roztok byl kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Takto upravená mobilní fáze byla zfiltrována přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,2 μm .

3.3.5 Příprava standardů (vzorků) pro analýzu

Jako standardy sloužily roztoky kyseliny jablečné a vinné v příslušné mobilní fázi. U některých mobilních fází byly standardy připraveny také rozpuštěním v redestilované vodě. Pro stanovení byly vzorky připraveny ve dvou koncentracích 100 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorek byl zfiltrován pomocí stříkačkového nylonového mikrofiltru Cronus s póry o velikosti 0,45 μm . Roztoky standardů byly připravovány vždy čerstvé.

3.4 Experimentální podmínky

Během experimentu byla udržována stabilní teplota 30 $^{\circ}\text{C}$ na termostatu kolony a stabilní průtok mobilní fáze o rychlosti 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Doba jednotlivých analýz se pohybovala od 10 do 20 minut, podle předpokládané odezvy detektoru. Tlak se měnil v závislosti na složení mobilní fáze a délce kolony v rozmezí 80 – 130 barů, což odpovídá 8 – 13 MPa. Pro každý vzorek, mobilní fázi a kolonu byla provedena série testů s různými potenciály na elektrodách, napětí na gaurd cele bylo voleno vždy minimálně o 100 až 150 mV vyšší než na analytických celách.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné na koloně Ascentis™ C18 s ECD detekcí

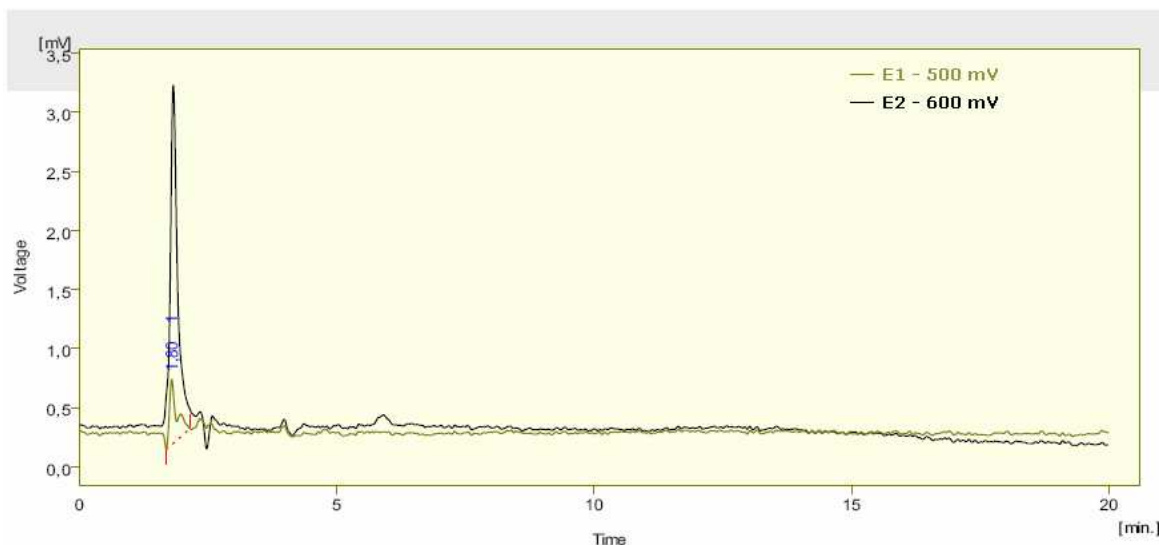
Standardní roztoky kyselin jablečné a vinné byly separovány na koloně Ascentis™ C18 za použití 4 různých mobilních fází. Během analýz byl postupně měněn potenciál na elektrodách a zaznamenávána případná odezva pomocí ECD detektoru.

4.1.1 Kyselina jablečná v mobilní fázi 1

Tab.č. 5: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Ascentis™ C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--|--|-----------------------------------|------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 69 : 1 : 30 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | 100, 200 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | | -200, -100 | – |
| | Kyselina jablečná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |

Z uvedených výsledků vyplývá, že se za daných podmínek nezdařilo zaznamenat řádnou odezvu detektoru pro stanovení kyseliny jablečné. Během stanovení byla také nastříknuta mobilní fáze při příslušném napětí, což umožnilo vyloučit případnou odezvu mobilní fáze.



Obr. č. 11 – Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

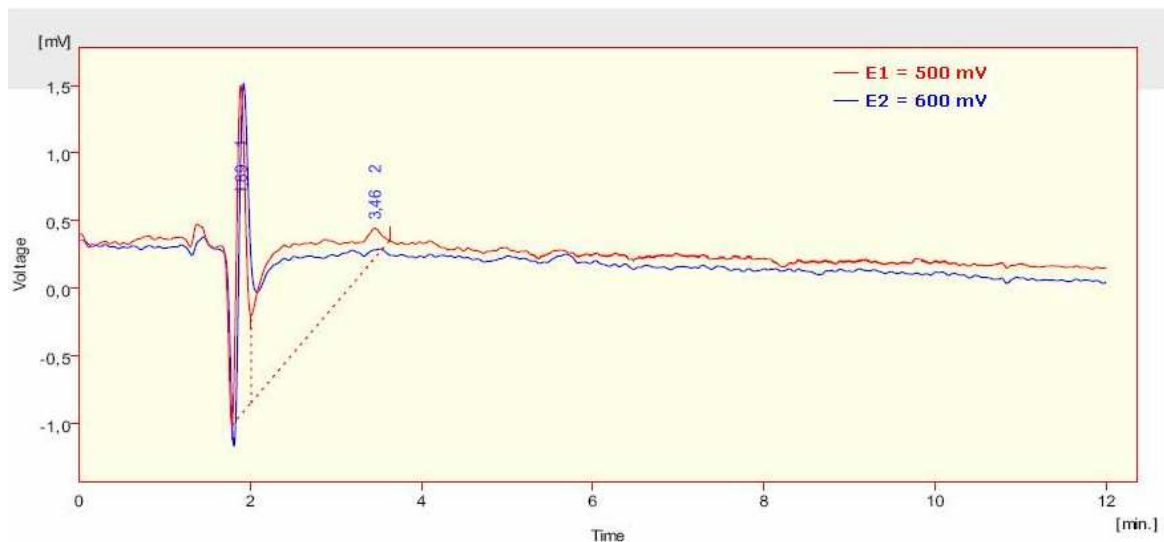
Na chromatogramu byl pozorován pík v retenčním čase 1,80 min, po srovnání chromatografu s mobilní fází a odezvou dále měřené kyseliny vinné byla tato odezva vyhodnocena jako negativní.

4.1.2 Kyselina jablečná v mobilní fázi 2

Tab.č. 6: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně AscentisTM C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|---|-----------------------------------|------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 0,5 : 99 : 0,5 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | + |
| | | 100, -100 | - |
| | | -500, -600 | - |
| | Kyselina jablečná v mobilní fázi 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 100, -100 | - |

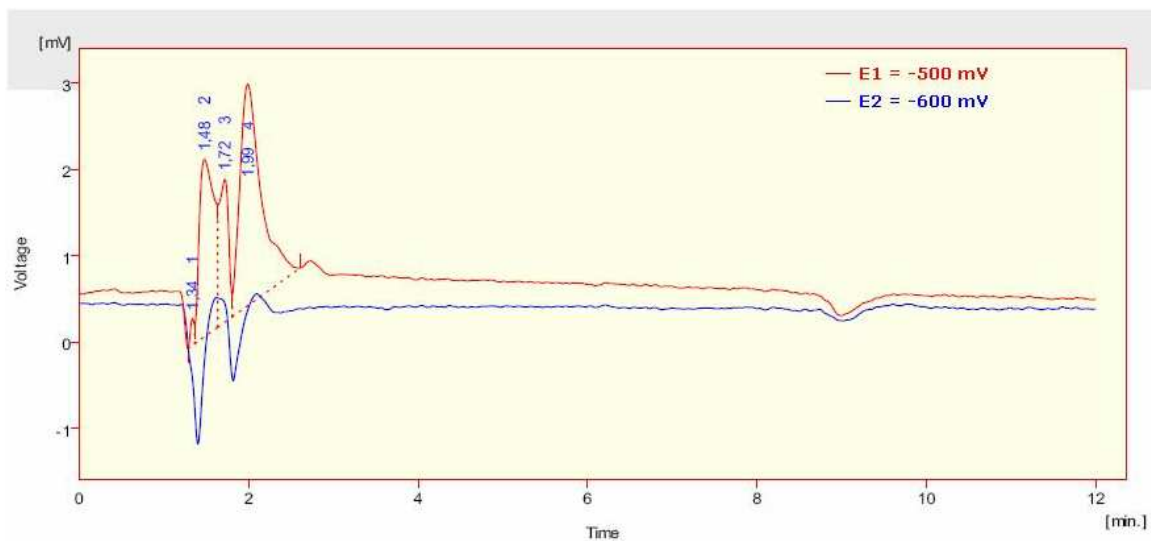
Během měření byla pozorována slabá odezva kyseliny jablečné v koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za použití mobilní fáze 2. Separace proběhla na koloně Ascentis™ C18, detekce při nastaveném potenciálu $E1 = 500 \text{ mV}$ a $E2 = 600 \text{ mV}$.



Obr. č. 12 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona Ascentis™ C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

Při nastaveném potenciálu $E1 = 500 \text{ mV}$ a $E2 = 600 \text{ mV}$ byla zaznamenána velmi slabá odezva kyseliny jablečné v retenčním čase 3,46 min. Pozorovaná odezva však byla prakticky na hranici šumu detektoru a pro reálné vzorky by byla nepoužitelná. Výraznější odezva byla zaznamenána na 1. kanálu při napětí 500 mV.

Nastavení záporného potenciálu -500 a -600 mV neumožnilo detekci kyseliny jablečné (viz Obr. č. 13).



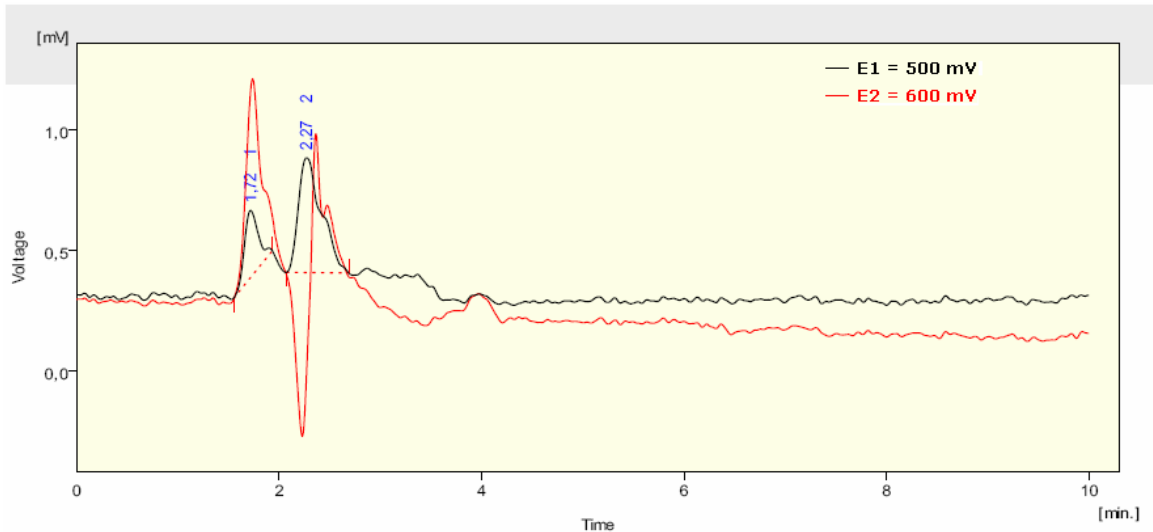
Obr. č. 13 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona Ascentis™ C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = -500 \text{ mV}$, $E2 = -600 \text{ mV}$

4.1.3 Kyselina jablečná v mobilní fázi 4

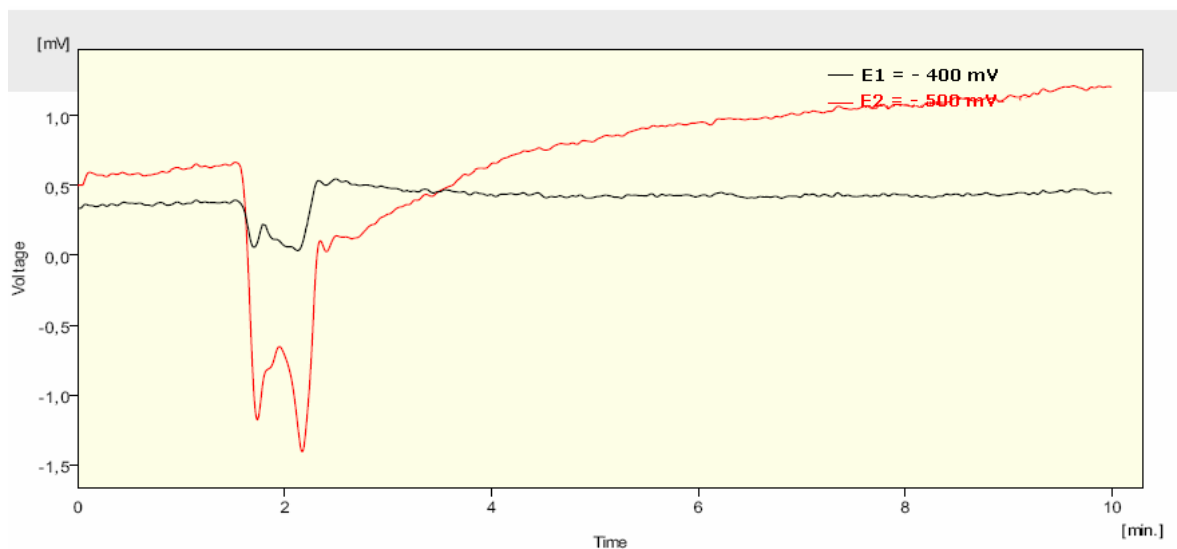
Tab.č. 7: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Ascentis™ C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|---|-----------------------------------|------------------|
| 0,05 mol.dm ⁻³ KH ₂ PO ₄ + H ₃ PO ₄ na pH 3 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | + |
| | | 300, 100 | - |
| | | 100, -300 | - |
| | | -400, -500 | - |
| | Kyselina jablečná v mobilní fázi 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | + |

Během stanovení byla pozorována slabá pozitivní odezva při napětí 500 a 600 mV, kde retenční čas kyseliny jablečné byl zaznamenán ve 2,30 minutě. Jako zcela nevhodný se ukázal záporný potenciál (-400, -500 mV), kdy došlo k rozbíhání základní line odezvy detektoru.



Obr. č. 14 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV



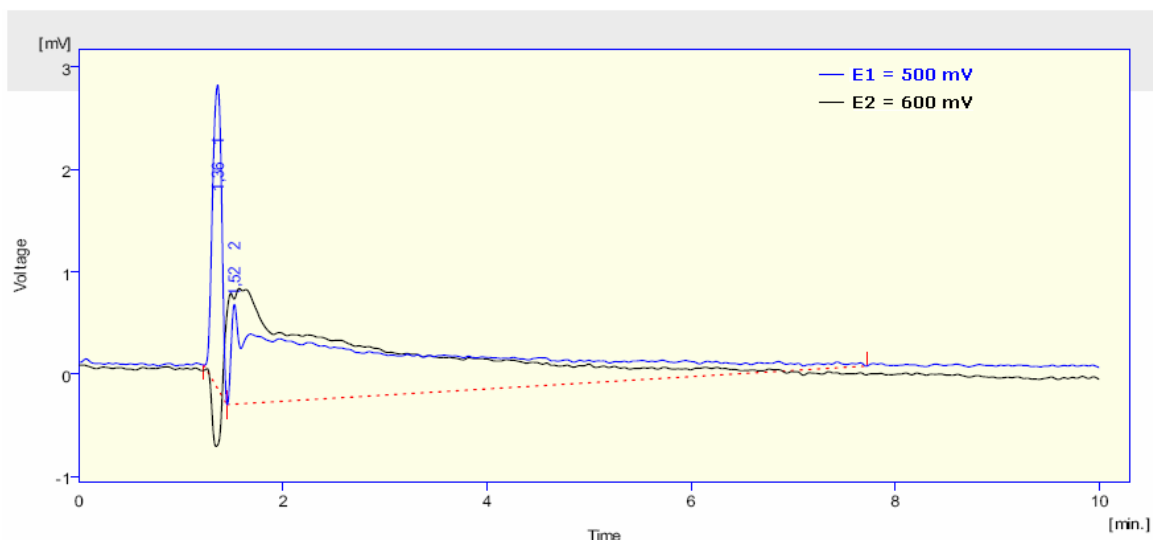
Obr. č. 15 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = -400 mV, E2 = -500 mV

4.1.4 Kyselina vinná v mobilní fázi 1

Tab.č. 8: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Ascentis™ C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--|---|--------------------------------------|---------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 69 : 1 : 30 | Kyselina vinná v mobilní fázi 100 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | 100, 200 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | Kyselina vinná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |

Z uvedených výsledků je patrné, že kombinace těchto parametrů nebyla vhodná pro stanovení kyseliny vinné. Na chromatogramu byla pozorována jen odezva mobilní fáze, viz obr. č. 16.



Obr. č. 16 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

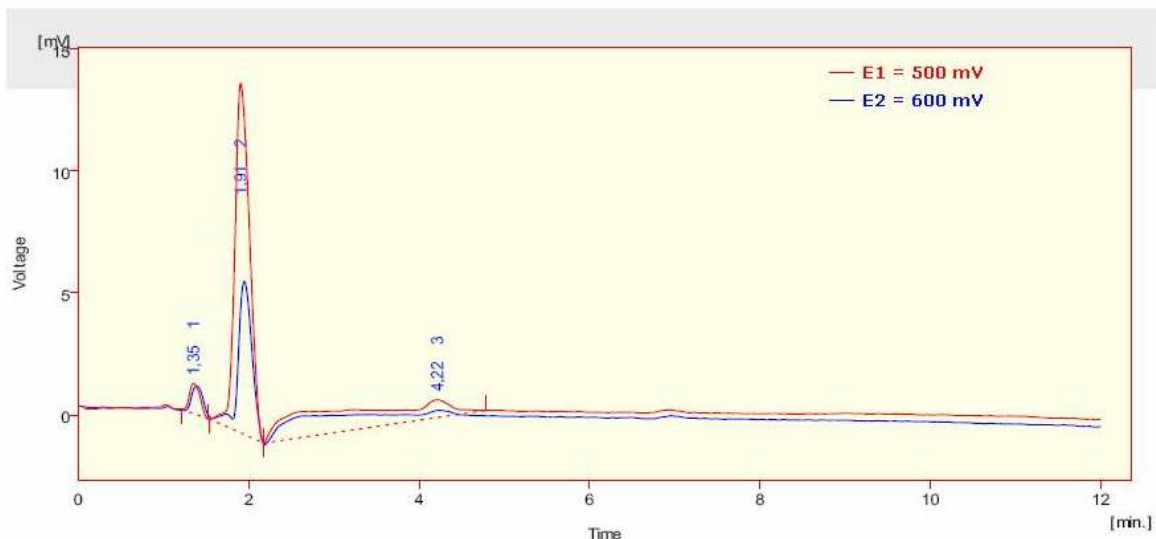
4.1.5 Kyselina vinná v mobilní fázi 2

Tab.č. 9: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně AscentisTM C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|--|-----------------------------------|------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 0,5 : 99 : 0,5 | Kyselina vinná v mobilní fázi 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | | -200, -100 | – |
| | Kyselina vinná v mobilní fázi 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 100, -100 | – |
| | | -500, -600 | – |

Při použití této mobilní fáze a daných parametrů nebyla zaznamenána pozitivní odezva na detektoru. Pro zkoušku byla použita velmi vysoká koncentrace analytu ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

při vloženém potenciálu 500 a 600 mV. V tomto případě byla pozorována jen velmi slabá odezva v retenčním čase 4,22 min. Navíc se nepodařilo prokázat, že se jedná o kyselinu vinnou.



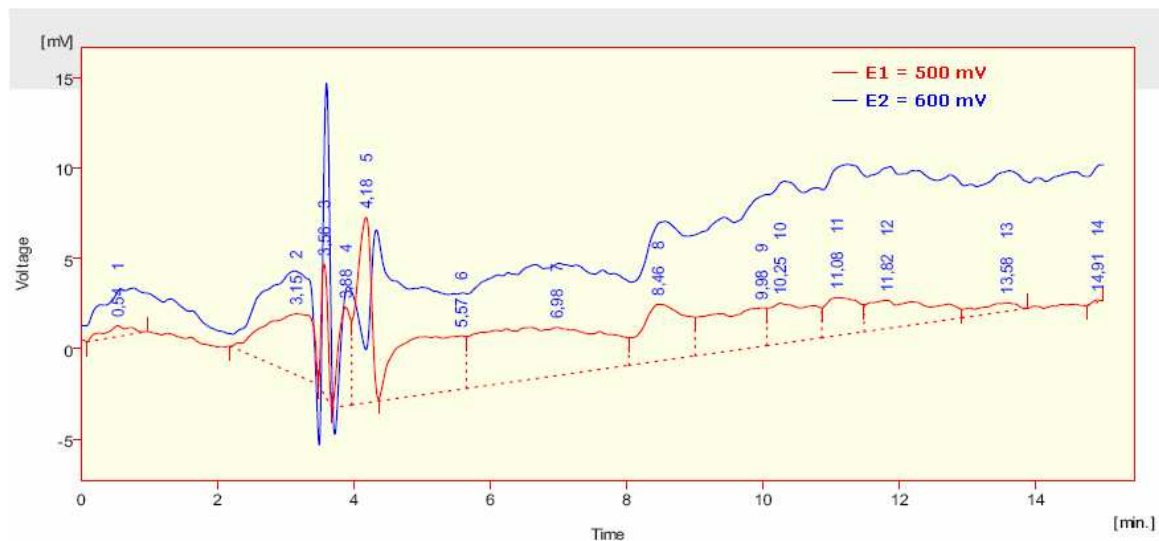
Obr. č. 17 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $1500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

4.1.6 Kyselina vinná v mobilní fázi 3

Tab.č. 10: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně AscentisTM C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--------------|--|-----------------------------------|------------------|
| MDTM | Kyselina vinná v mobilní fázi $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |

Díky nestabilní odezvě na detektoru nebyla tato mobilní fáze testována za dalších podmínek.



Obr. č. 18 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

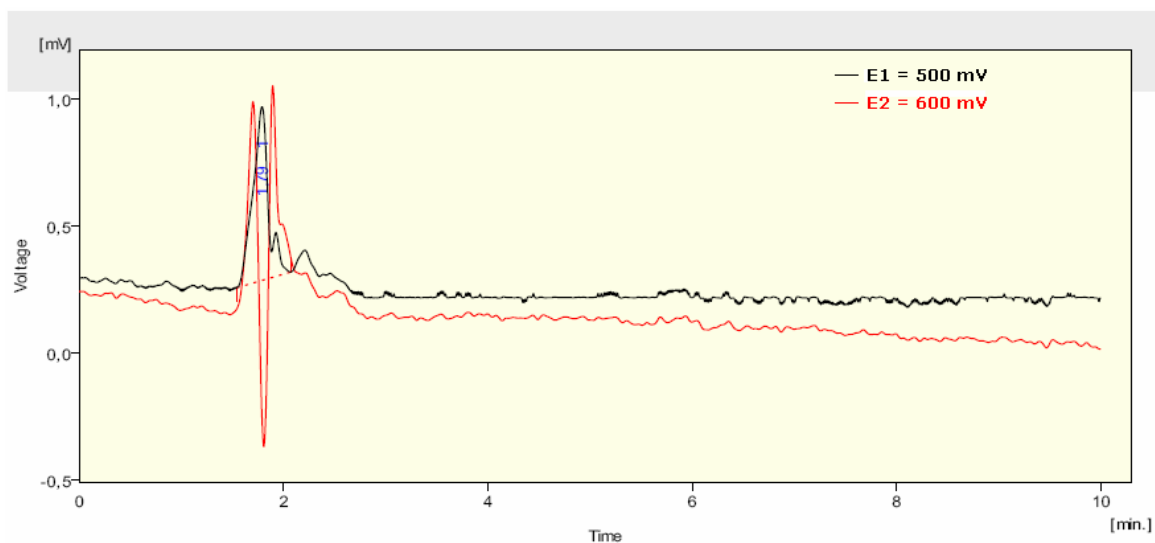
Za těchto podmínek se projevila značná nestabilita mobilní fáze a kolísání základní linie.

4.1.7 Kyselina vinná v mobilní fázi 4

Tab.č. 11: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně AscentisTM C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|--|-----------------------------------|------------------|
| 0,05 mol.dm ⁻³ KH ₂ PO ₄ + H ₃ PO ₄ na pH 3 | Kyselina vinná v mobilní fázi 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | 300, 100 | – |
| | | 100, -300 | – |
| | | -400, -500 | – |
| | Kyselina vinná v mobilní fázi 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | 300, 100 | – |

Za uvedených podmínek se nepodařilo stanovit kyselinu vinnou, na chromatogramech byly zaznamenány pouze odezvy mobilní fáze.



Obr. č. 19 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona AscentisTM C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

Na tomto chromatogramu byla pozorována pouze odezva mobilní fáze v čase 1,79 minuty.

4.2 Možnosti detekce kyseliny jablečné a vinné na koloně Discovery C18 s ECD detekcí

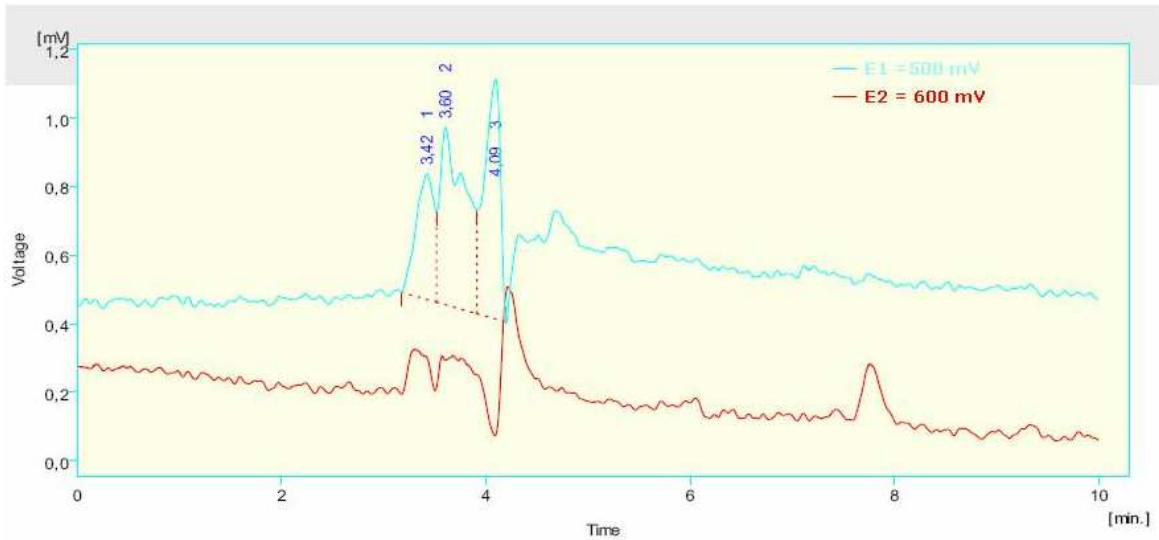
Standardní roztoky kyselin jablečné a vinné byly separovány na koloně Discovery C18 za použití čtyř různých mobilních fází. Během analýz byl postupně měněn potenciál na elektrodách a zaznamenávána případná odezva na ECD detektoru.

4.2.1 Kyselina jablečná v mobilní fázi 1

Tab.č. 12: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18

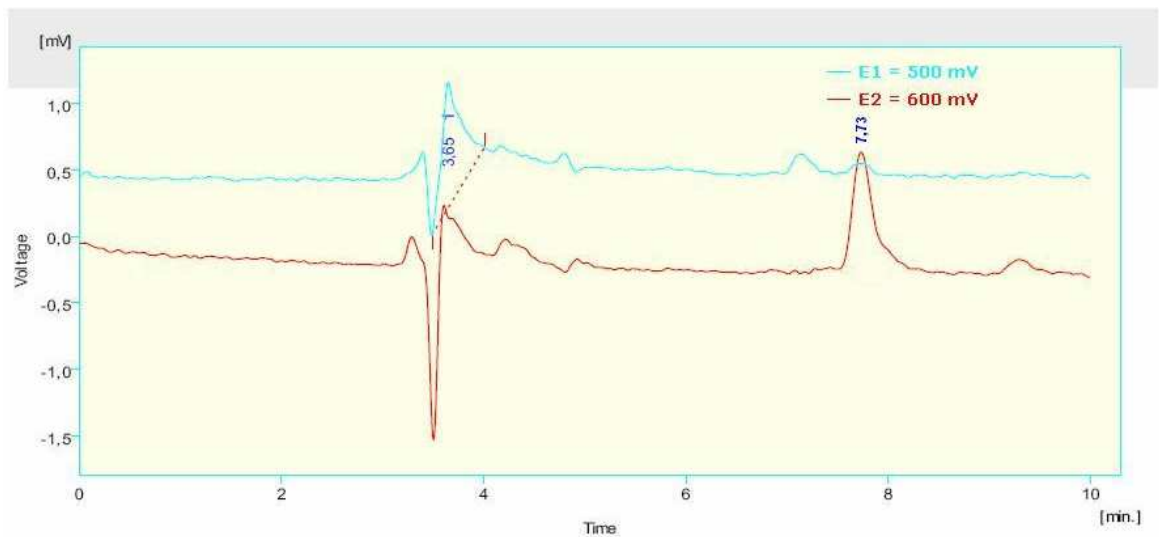
| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--|--|-----------------------------------|------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 69 : 1 : 30 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | 100, 200 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | | -200, -100 | – |
| | Kyselina jablečná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | -200, -100 | – |

Podle získaných výsledků se nepodařilo jednoznačně určit kyselinu jablečnou. Použitá mobilní fáze vedla k nestabilitě kyseliny jablečné, kde případné produkty degradace eluovaly v časovém intervalu 3,4 – 4,8 minuty.



Obr. č. 20 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

Na kanálu E1 při napětí 500 mV jsou patrné produkty degradace kyseliny jablečné. Na E2 kanálu při vloženém potenciálu 600 mV byl pozorován pík v retenčním čase přibližně 7,7 minuty. Tato odezva byla vyhodnocena jako odezva mobilní fáze, což bylo jasně patrné z chromatogramu odezvy mobilní fáze na obrázku č.21.



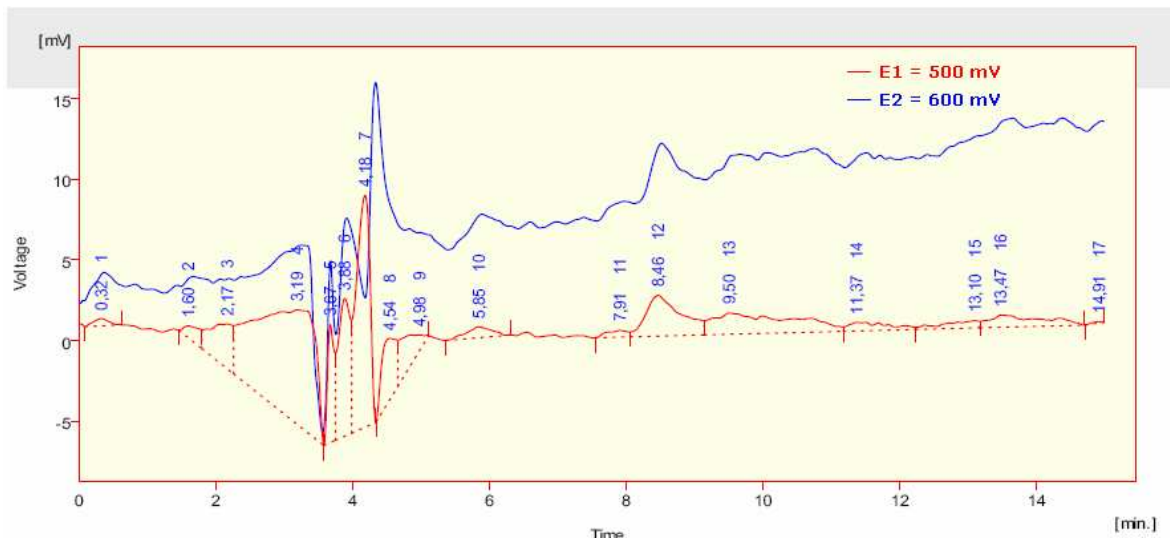
Obr. č. 21 - Odezva mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

4.2.2 Kyselina jablečná v mobilní fázi 3

Tab.č. 13: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--------------|---|-----------------------------------|------------------|
| MDTM | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | 100, 200 | – |

Tato mobilní fáze měla silnou odezvu a nestabilitu. Docházelo také ke značné kolísavosti a rozbíhání základní line.



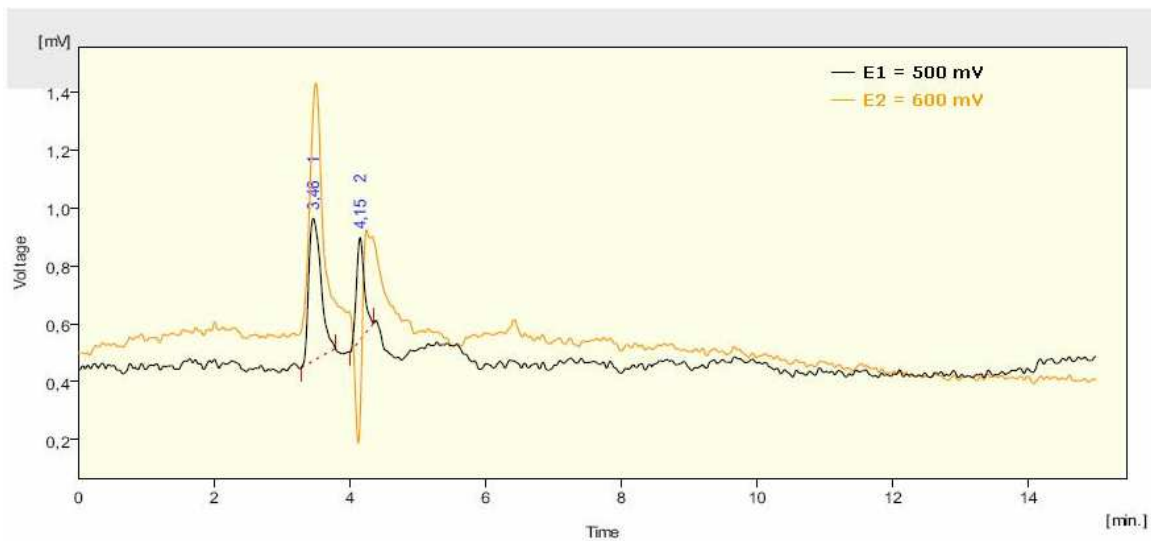
Obr. č. 22 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

4.2.3 Kyselina jablečná v mobilní fázi 4

Tab.č. 14: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|--|--------------------------------------|---------------------|
| 0,05 mol.dm ⁻³ KH ₂ PO ₄ + H ₃ PO ₄ na pH 3 | Kyselina jablečná v mobilní fázi 100 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | + |
| | | 300, 100 | - |
| | | 100, -300 | - |
| | | -400, -500 | - |
| | | -200, -100 | - |
| | Kyselina jablečná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | + |
| | | 100, -300 | - |

Při vloženém napětí 500, 600 mV byla pozorována odezva kyseliny jablečné v retenčním čase 4,15 – 4,22 minut (viz Obr. č. 23). Standard byl rozpuštěn v mobilní fázi.



Obr. č. 23 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

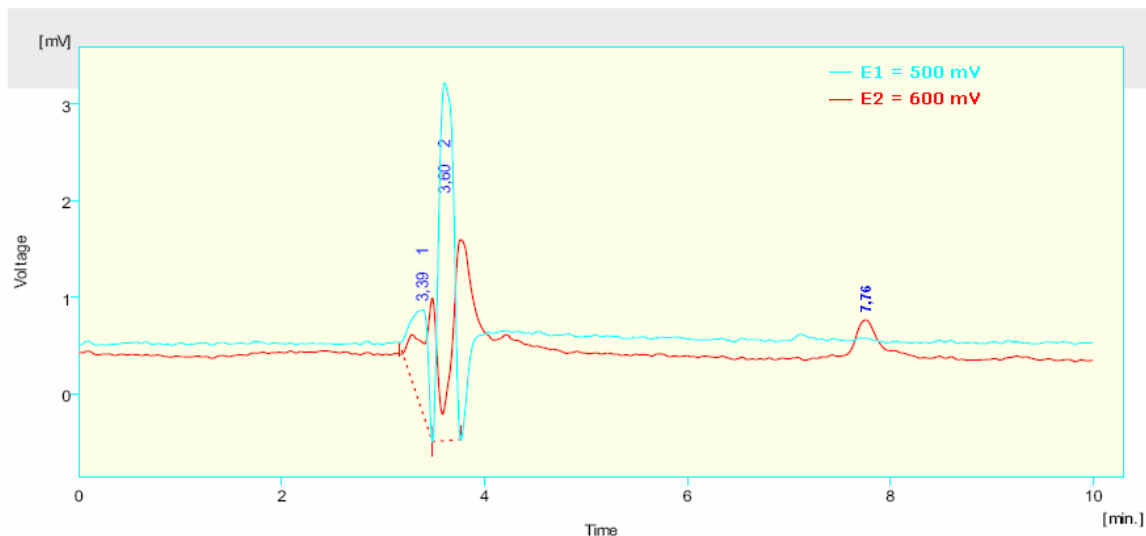
Při napětí 500 mV byla pozorována odezva kyseliny jablečné v čase $4,15$ minut. Pík v čase $3,48$ minuty přísluší odezvě mobilní fáze. Při zvýšené koncentraci vzorku $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se úměrně zvětšila také plocha píku, které je přímo úměrná koncentraci analytu.

4.2.4 Kyselina vinná v mobilní fázi 1

Tab.č. 15: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--|---|--------------------------------------|---------------------|
| rH ₂ O : Met-OH : H ₃ PO ₄ 69 : 1 : 30 | Kyselina vinná v mobilní fázi 100 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | 100, 200 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | | -200, -100 | – |
| | Kyselina vinná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 400, 500 | – |
| | | 300, 400 | – |
| | | 100, 200 | – |
| | | -100, 100 | – |
| | | -200, -100 | – |

Kyselina vinná se nedařila za těchto zvolených podmínek stanovit. Analyt byl rozpuštěn v mobilní fázi. Pro vyhodnocení byla také při příslušném napětí nastříknuta také mobilní fáze a redestilovaná voda.



Obr. č. 24 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$, $E2 = 600 \text{ mV}$

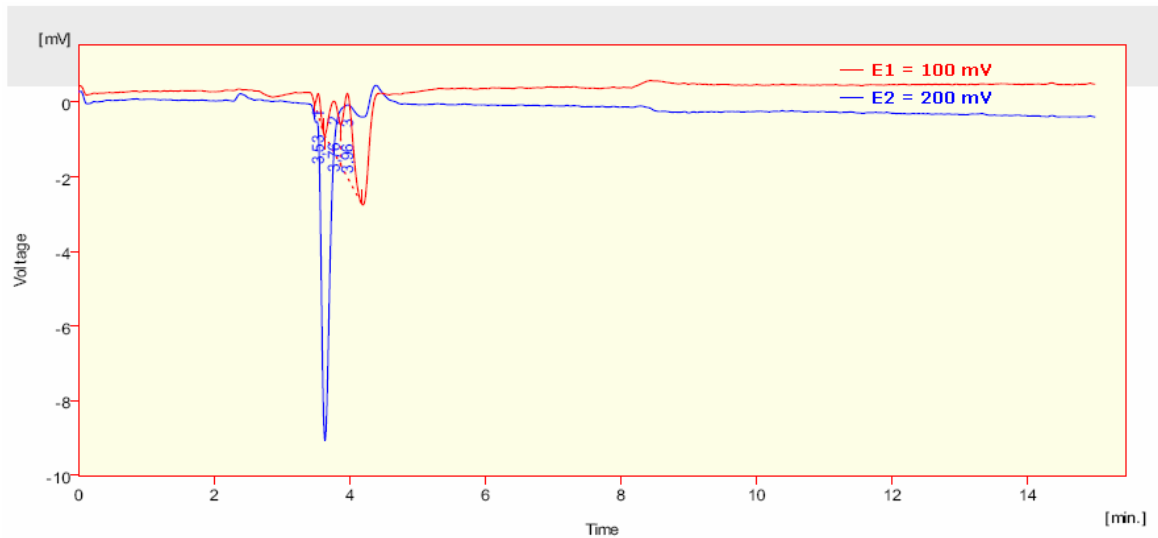
Detekce kyseliny vinné se za těchto podmínek nezdařila, při porovnání s chromatogramem odezvy mobilní fáze 1 (na koloně Discovery C18) na obrázku číslo 21 je patrné, že pík v retenčním čase 7,76 minuty přísluší mobilní fázi.

4.2.5 Kyselina vinná v mobilní fázi 3

Tab.č. 16: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí $E1, E2 \text{ [mV]}$ | Odezva detektoru |
|--------------|--|---|------------------|
| MDTM | Kyselina vinná v mobilní fázi $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | 100, 200 | – |

Díky silné odezvě a nestabilitě mobilní fáze se dále nepokračovalo ve změnách napětí. Při napětí na elektrodách 100 a 200 mV byly sledovány píky v negativní oblasti.



Obr. č. 25 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru $E1 = 100 \text{ mV}$, $E2 = 200 \text{ mV}$

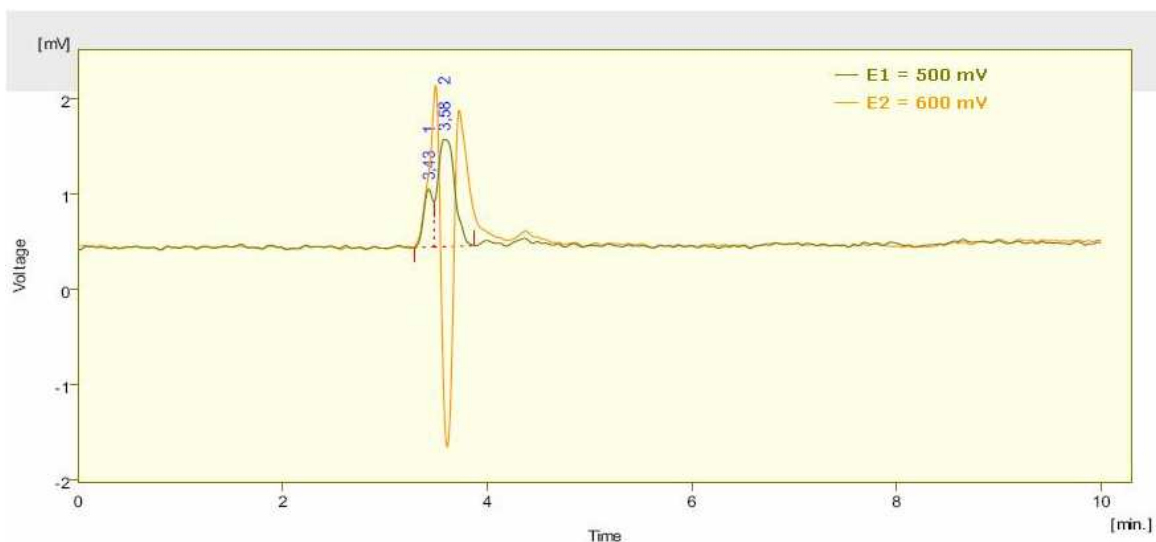
4.2.6 Kyselina vinná v mobilní fázi 4

Tab.č. 17: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|--|--|-----------------------------------|------------------|
| $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ + H_3PO_4 na pH 3 | Kyselina vinná v mobilní fázi $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 500, 600 | – |
| | | 300, 100 | – |
| | | 100, -300 | – |
| | | -400, -500 | – |

| Mobilní fáze | Standard a koncentrace | Elektrodové napětí E1, E2 [mV] | Odezva detektoru |
|---|---|-----------------------------------|------------------|
| 0,05 mol.dm ⁻³ KH ₂ PO ₄ + H ₃ PO ₄ na pH 3 | Kyselina vinná v mobilní fázi 500 µg.ml ⁻¹ | 500, 600 | – |
| | | 300, 100 | – |
| | | 100, -300 | – |
| | | -400, -500 | – |

Jak z uvedené tabulky vyplývá, detekce kyseliny vinné se za těchto podmínek nezdařila. Na získaných chromatogramech byla pozorována jen odezva mobilní fáze. Ani po odečtení vlivu mobilní fáze (případně redestilované vody) nebylo možné jednoznačně potvrdit odezvu kyseliny vinné.



Obr. č. 26 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 500 µg.ml⁻¹, mobilní fáze 4, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min⁻¹, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

4.3 Stanovení kyseliny jablečné a vinné na koloně Supelcosil LC8 s UV-VIS detekcí

Pro detekci kyseliny vinné a jablečné pomocí UV detektoru lze v literatuře nalézt řadu odkazů (viz tabulka č. kapitola 2.2.4). V našich podmínkách byla použita mobilní fáze označená číslem 1, kterou použili Radin a kol. pro stanovení kyseliny vinné při vlnové délce $\lambda = 210$ nm.

Standardy o koncentracích 100 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly získány rozpuštěním v příslušné mobilní fázi a také v redestilované vodě. Takto připravené standardy byly postupně detekovány při vlnových délkách 210, 215 a 230 nm. Jen doplňkově byly připraveny také roztoky kyselin šťavelové a jantarové.

Separace proběhla na koloně Supelcosil LC 8 (150 × 4,6 mm; 5 μm). Během experimentu byly dodržovány následující podmínky: průtok mobilní fáze 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota 25 °C a tlak 53 bar, což odpovídá tlaku 5,3 MPa.

Lepších výsledků bylo dosaženo při rozpuštění standardů přímo v mobilní fázi. Tento fakt byl jasně patrný u kyseliny vinné, kde standard rozpuštěn v redestilované vodě zůstal bez odezvy. Naopak, byla-li kyselina vinná rozpuštěná v mobilní fázi, bylo dosaženo velmi dobré odezvy při všech zvolených vlnových délkách. Retenční čas kyseliny vinné se pohyboval okolo 2,58 – 2,67 minuty (viz příloha č. III). Zároveň byla ověřena možná absorbance samotné mobilní fáze pro ověření, zda bude rušit absorbanci vzorku.

Odezva kyseliny jablečné na UV detektoru měla charakter několika píků v rozmezí 2,8 – 4,5 minuty.

Jen na okraj byly připraveny standardy kyseliny šťavelové a jantarové, kde kyselina šťavelová měla velmi pěknou odezvu při vlnových délkách 210 a 215 nm (viz příloha č. III).

4.4 Diskuze

Pro stanovení organických kyselin v různých vzorcích byla popsána řada metod. Mato I. a kol. ve svém přehledu pojednává o různých metodách pro stanovení organických kyselin v hroznové šťávě a víně. Zde shrnuje řadu možností pro detekce kyselin jablečné, vinné i pro mnoho dalších. Ve zkratce zde popisuje použití spektrofotometrických,

enzymatických, elektroforetických a především chromatografických metod. Zmiňuje se zde o několika typech detekce, mobilních fázích a separačních mechanismech [58].

Další možnosti detekce organických kyselin popisují Jun X. a kol.; Shui G. a kol. a Kerem Z. kteří využívají HPLC s reverzními fázemi a UV detekcí. Jako vzorky zde slouží víno, ovocné džusy a nealkoholické nápoje [50] [55][59].

Pro stanovení kyselin jablečné a vinné byly vybrány čtyři mobilní fáze a dvě kolony pro RP-HPLC. Detekce byla prováděna na systému Coulochem III (Esa, USA).

Mobilní fáze 1 byla připravena podle Radin L. a kol. ve složení $rH_2O : Met-OH : H_3PO_4$ v poměru 69 : 1 : 30 a upravena na pH 2,9 pomocí toztoku KOH. Za uvedených podmínek nebyla zaznamenána řádná odezva na detektoru při použití kolony AscentisTM C18 ani při zapojení kolony Discovery C18.

Mobilní fáze 2 je modifikací mobilní fáze číslo 1, kde se mění poměr složek $rH_2O : Met-OH : H_3PO_4$ na 0,5 : 99 : 0,5. V tomto případě byla zaznamenána jen slabá odezva kyseliny jablečné při nastavení detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$ a $E2 = 600 \text{ mV}$ na koloně AscentisTM C18. Odezva byla velmi slabá, prakticky na hranici šumu detektoru a pro reálných vzorek nevhodná. Pro kyselinu vinnou na této koloně s mobilní fází 2 nebyla zaznamenána pozitivní odezva. Stejně neúčinná byla za těchto podmínek i druhá kolona Discovery C18 pro obě zkoušené kyseliny.

Podle aplikačních listů firmy Esa [57] byla připravena mobilní fáze 3 (MDTM), která je primárně určená pro stanovení biogenních aminů. Při přípravě této mobilní fáze jsme byli nuceni vyměnit některé složky mobilní fáze, které v daném okamžiku nebyly dostupné. Možná i díky tomu se tato mobilní fáze jevila jako nevhodná pro detekci organických kyselin, protože byla pozorována její silná odezva, rozbíhavost a kolísání základní linie. Díky tomu byla zkoušena jen krátce při dvou sadách potenciálů.

Další použitou mobilní fází (4) byl fosfátový pufr s koncentrací $0,05 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ doplněný o H_3PO_4 na pH 3. Zde byla pozorována menší odezva kyseliny jablečné při zapojení kolony AscentisTM C18 i Discovery C18 s nastaveným potenciálem 500 a 600 mV. Kyselinu vinnou se nezdařilo prokázat ani na jedné z kolon. Zde je nutné podotknout, nutnost přídavku metanolu či jiné organické složky do této mobilní fáze. Tento přídavek by mohl podpořit separaci na reverzních fázích a zároveň bude mobilní fáze

šetrnější k C18 kolonám. Podle zdroje [60] by mohlo dojít k destrukci kolony při dlouhodobém užívání, protože C18 kolony mají zcela hydrofóbní povrch stacionární fáze.

Mobilní fáze 1 byla původně určená pro vysokouúčinnou kapalinovou chromatografii s UV-VIS detekcí. Tato možnost byla potvrzena za použití kolony Supelcosil LC8 a parametrů detektoru $\lambda_1 = 210$ nm, $\lambda_2 = 215$ nm a $\lambda_3 = 230$ nm. Velmi dobrá odezva byla pozorována pro kyselinu vinnou.

System HPLC má řadu součástí, které je možné měnit a upravit tak podmínky pro detekci žádaného analytu, například by se ještě mohlo zvýšit vložené napětí na elektrodách.

Literatura nabízí řadu možností, které by mohly být dále uplatněny pro stanovení kyseliny jablečné a vinné s elektrochemickou detekcí [44] [52]. Jednou z možností je zvýšit vodivost roztoku (mobilní fáze) přidávkem solí (např. chloristanů). Tím se zlepší možnost přenosu elektronů během oxidačně-redukčních reakcí, které jsou podstatou elektrochemické detekce.

Stanovení organických kyselin lze do jisté míry podpořit pomocí pH. Volba pH se ovšem odvíjí také od použité kolony, kde pro C18-kolony je toto rozmezí nejčastěji mezi hodnotami 2 – 8. Velmi nízké pH mobilní fáze může poškozovat kovové části aparatury.

Pro podpoření separace na reverzních fázích je důležité udržet kyselinu v nedisociovaném stavu. Snyder a kol. uvádí, že je vhodné přiblížit pH mobilní fáze s disociační konstantou kyseliny. Uvážíme-li, že pro kyselinu vinnou je $pK_{a1} = 2,96$, mohlo by snížení pH mobilní fáze přinést lepší výsledky [34] [43].

Některé prameny uvádí také možnosti pro stanovení organických kyselin pomocí derivatizace. Kotani A. a kol. uvádí možnost použití 2-metyl-1,4-naftochinonu (známý také jako vitamin K₃ neboli menandion) s elektrochemickou detekcí [52].

Organické kyseliny je také možné rozdělit na základě iontově-výměnné nebo iontově-párové chromatografie. Zde je vhodné disociaci kyselin naopak podpořit. Pro separaci organických kyselin se používají slabé i silné měniče iontů, jako mobilní fáze může být voda, zředěné roztoky kyselin a některých pufrů [44].

Další možností je opustit elektrochemickou detekci a použít již zmiňovanou UV detekci s vhodně zvolenou vlnovou délkou.

Také je možné použít jiné typy kolon, např. Phenomenex Synergi Hydro – RP nebo Phenomenex Rezex, pomocí kterých je možné stanovit organické kyseliny vedle sacharidů.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo podat návrh či doporučení pro stanovení kyseliny jablečné a vinné pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí za dostupných podmínek.

Pro separaci byly použity kolony AscentisTM C18 a Discovery C18 a čtyři různé mobilní fáze. Standardy byly rozpuštěny v mobilní fázi a po nastříknutí injekčního objemu 20 μl byla sledována odezva na detektoru při zvoleném napětí.

Pouze velmi slabá odezva, prakticky však na hranici šumu detektoru, byla pozorována u kyseliny jablečné v kombinaci s kolonou AscentisTM C18 a mobilní fází o složení: redestilovaná voda (rH_2O), metanol (Met-OH) a H_3PO_4 v poměru 0,5 : 99 : 0,5 a při parametrech detektoru $E_1 = 500 \text{ mV}$ a $E_2 = 600 \text{ mV}$. Slabá odezva byla také zaznamenána v případě kyseliny jablečné na koloně AscentisTM C18 s mobilní fází $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 o pH 3. U této mobilní fáze je nutné upravit obsah organické složky (metanol nebo acetonitril).

Kyselina jablečná poskytla na koloně Discovery C18 lehce pozitivní odezvu jen s mobilní fází $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 o pH 3 s pomocí H_3PO_4 .

V případě kyseliny vinné se během stanovení nepodařilo jednoznačně potvrdit pozitivní odezvu detektoru. Kyselina vinná byla dobře detekovatelná při použití UV detektoru. Pro tento systém byla použita mobilní fáze o složení redestilovaná voda (rH_2O), metanol (Met-OH) a H_3PO_4 v poměru 69 : 1 : 30 a vlnové délky $\lambda = 210, 215$ a 230 nm pro nastavení detektoru.

Pro objasnění jsou v praktické části práce uvedeny chromatogramy s pozitivními, ale i některé s negativními výsledky.

Z uvedených výsledků vyplývají možnosti pro modifikaci zvolených parametrů. Pro další případné experimenty by bylo vhodné vyzkoušet vyšší potenciály na elektrodách, důsledně upravovat pH mobilní fáze, čímž je podpořen nedisociovaný stav molekuly nebo vyzkoušet přidavek solí pro zvýšení vodivosti mobilní fáze.

Podle dostupnosti by bylo také možné použít kolony pro výměnu iontů s příslušnými mobilními fázemi, případně zvolit jiný typ detekce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Karboxylové kyseliny [on line]. [citováno 25.3.2009]. Dostupné z www:
http://cs.wikipedia.org/wiki/Karboxylov%C3%A9_kyseliny
- [2] Karboxylové kyseliny [on line]. [citováno 25.3.2009]. Dostupné z www:
www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/cooh.doc
- [3] ČERVINKA, O., DĚDEK, V., FERLES, M. *Organická chemie: učebnice pro vysoké školy chemicko-technologické*, SNTL, Praha 1991, ISBN: 80-85427-03-6
- [4] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2005, ISBN: 80-7318-295-5
- [5] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, SNTL, Praha, 1983
- [6] *Analýza potravin přírodní látky*, Distanční text část II [on line]. [citováno 28.3.2009]. Dostupné z www: http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/MBMN5qr4R-GtaxJtkEDk3ZRnfzdC13KnHiZCOAG1EmY1/M0028_chemie_a_analyza_potravin%5Cdistancni_text_II%5CM0028_chemie_a_analyza_potravin_distancni_text_II.pdf
- [7] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, OSSIS, Tábor, 1999, ISBN: 80-902391-5-3
- [8] HRUDKOVÁ, A., MARKVART, J. *Nealkoholické nápoje*, SNTL, Praha, 1989
- [9] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor, 1999, ISBN: 80-902391-4-5
- [10] BRUL, S., COOTE, P. Preservative agents in foods: Mode of action and antimicrobial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1999, p. 1-17
- [11] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*, SNTL, Praha, 1988
- [12] *Analýza a hodnocení potravin II*, Distanční text [on line]. [citováno 28.3.2009]. Dostupné z www: http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/6we4pdCK00mMF-EIKf59HiWiDySbLgPGHiT4UupBWT01/M0032_analyza_a_hodnoceni_potravin%5Cdistancni_text_II%5CM0032_analyza_a_hodnoceni_potravin_distancni_text_II.pdf

- [13] WROLSTAD, R. E. et al. *Handbook of food analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005
- [14] *Malic acid* [on line]. [citováno 7.4.2009] Dostupné z www:
http://en.wikipedia.org/wiki/Malic_acid
- [15] ASHURT, P. R. et al. *Chemistry & Technology of soft drinks and fruit juices*, Blackwell Publishing Ltd, 2005
- [16] *Acid in wine*, [on line]. [citováno 7.4.2009] Dostupné z www:
http://en.wikipedia.org/wiki/Acids_in_wine
- [17] PRESEČKI, A. V., ZELIC, B., VASIC-RAČKI, D. Comparasion of the L-malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, Vol. 41, 605 - 612
- [18] TAKATA, I., YAMAMOTO K., TOSA, T., CHIBATA, I. Screening of microorganisms having high fumarase activity and their immobilization with carrageenan, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1979, Vol. 7, 161 - 172
- [19] PELEG, Y., ROKEM, S., GOLDBERG, I., PINES, O. Inducible Overexpression of the FUMI Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: Localization of Fumarase and Efficient Fumaric Acid Bioconversion to L-Malic Acid, *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, Vol. 56, 2777 – 2783
- [20] NCBI Taxonomie, [on line]. [citováno 26.7.2009] Dostupné z www:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>
- [21] KOVÁČIKOVÁ, E., VOJŠŠÁTKOVÁ, A., HOLČÍKOVÁ, K., SIMONOVÁ, E. *Ovoce a zelenina potravinové tabulky*, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, 1997, ISBN: ISBN 80-85330-33-4
- [22] Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, Sbírka zákonů č. 4/2008 Sb.
- [23] *Malolactic fermentation*, [on line]. [citováno 12.5.2009] Dostupné z www:
http://en.wikipedia.org/wiki/Malolactic_fermentation
- [24] *Tartaric acid*, [on line]. [citováno 3.6.2009] Dostupné z www:
http://en.wikipedia.org/wiki/Tartaric_acid

- [25] Čištění vína, [on line]. [citováno 3.6.2009] Dostupné z www: <http://www.czechwines.cz/revivo5.htm>
- [26] Optické isomery, [on line]. [citováno 3.6.2009] Dostupné z www: <http://uoch.vscht.cz/cz/studium/bakalar/organika/Velebudice/Velebudice4.pdf>
- [27] *Food Ingredients - L and DL-Tartaric Acid - Current Status and Outlook by 2015*, [on line]. [citováno 14.6.2009] Dostupné z www: <http://www.lhepner.com/food28.html>
- [28] *Method for producing L(+)-tartaric acid*, [on line]. [citováno 10.7.2009] Dostupné z www: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nphParser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u%2Fnethtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=4,028,185.PN.&OS=PN/4,028,185&RS=PN/4,028,185>
- [29] ROSENBERG, M., MIKOVÁ, H., KRISCARONTOFIKOVÁ, L. Production of L-tartaric acid by immobilized bacterial cells *Nocardia tartaricans*, *Biotechnology Letters*, 1999, Vol. 21, 491 - 495
- [30] *Process for producing D-(-)-Tartaric acid*, [on line]. [citováno 10.7.2009] Dostupné z www: <http://v3.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=EP&NR=0311835&KC=&FT=E>
- [31] *Tartaric acid*, [on line]. [citováno 7.4.2009] Dostupné z www: http://www.greatvistachemicals.com/industrial_and_specialty_chemicals/tartaric_acid.html
- [32] *Chromatografie – informační text*, [on line]. [citováno 10.7.2009] Dostupné z www: <http://www.eurochem.cz/index.php?COMPID=2145919255&DID=4458&LEV=2&ADRID=8&LA=CS&DT=4&MN=Chromatografie+-+informa%20E8n%20ED+text&ProdID=00021F06FD45F0860002ECE1>
- [33] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, ISBN: 80-86369-07-2
- [34] SNYDER, L. R., GLAJCH, J.L., KIRKLAND, J.J. *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1988, ISBN: 0-471-62782-8

- [35] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinové chromatografie*, Alfa, Bratislava, 1979
- [36] VOET, D., VOETOVÁ, J. *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, 1995, ISBN: 80-85605-44-9
- [37] *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*, [on line]. [citováno 14. 7. 2009] Dostupné z www: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [38] *Dávkovací ventily*, [on line]. [citováno 14.7.2009] Dostupné z www: <http://www.hplc.cz/>
- [39] *Chromatografická kolona*, [on line]. [citováno 14.7.2009] Dostupné z www: http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html
- [40] *Reversed-phase chromatography*, [on line]. [citováno 17.7.2009] Dostupné z www: http://en.wikipedia.org/wiki/Reversed-phase_chromatography
- [41] *Adsorbenty a chemicky vázané fáze v systému kapalina-tuhá fáze (LSC)*, [on line]. [citováno 17.7.2009] Dostupné z www: <http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>
- [42] *HPLC kolony na bázi kovů*, [on line]. [citováno 17.7.2009] Dostupné z www: <http://www.hplc.cz/Faq/zir-chrom.htm>
- [43] *Vliv pH mobilní fáze na retenci solutů*, [on line]. [citováno 20.7.2009] Dostupné z www: http://www.hplc.cz/Teorie/iont_suppres.htm
- [44] WURST, M., PACÁKOVÁ, V., ŠTULÍK, K., Vysokoučinné separační metody při analýze benzenkarboxylových kyselin, *Chemické Listy*, 2001, Vol. 95, 270 - 277
- [45] *ESA, Coulochem III*, [on line]. [citováno 24.7.2009] Dostupné z www: <http://www.kinesis.co.uk/instruments.asp?id=54>
- [46] *Derivates for HPLC-ECD*, ESA-Technical note, [on line]. [citováno 20.7.2009] Dostupné z www: http://www.esainc.com/docs/spool/70-4849P_Derivatives.pdf
- [47] *Elektrochemické HPLC detektory*, [on line]. [citováno 21.7.2009] Dostupné z www: http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html

- [48] *Guidelines for mobile phase selection and preparation when using electrochemical detectors*, ESA-Technical note, [on line]. [citováno 20.7.2009] Dostupné z [www:http://www.esainc.com/docs/spool/704821P_Guidelines_for_Mobile_Phase.pdf](http://www.esainc.com/docs/spool/704821P_Guidelines_for_Mobile_Phase.pdf)
- [49] RADIN, L., PRONZATO, C., CASARETO, L., CALEGARI, L. Tartaric acid in wines may be useful for preventing renal calculi: Rapid determination by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1994, Vol. 17, 2231 - 2246
- [50] JUN, X., LIMA, J.L.F.C., MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Simultaneous determination of inorganic anions and carboxylic acids in wine using isocratic separation on a permanently coated reversed-phase column and UV indirect detection, *Analytica Chimica Acta*, 1996, Vol. 321, 263 - 271
- [51] ESCOBAL, A., GONZALEZ, J., IRIONDO, C., LABORRA, C. Liquid chromatographic determination of organic acids in txakoli from Bizkaia, *Food Chemistry*, 1997, Vol. 58, 381 - 384
- [52] KOTANI, A., MIYAGUCHI, Y., TOMITA, E., TAKAMURA, K., KUSU, F. Determination of organic acids by HPLC with electrochemical detection during wine brewing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, Vol. 52, 1440 - 1444
- [53] GARCÍA, R., MUNOZ, S. Determination of organic acids in grape musts, wines and vinegars by HPLC, *Journal of Chromatography A*, 1993, Vol. 655, 111 - 117
- [54] VÉRETTE, E., QIAN, F., MANGANI, F. On-line dialysis with HPLC for the automated preparation and analysis of sugar and organic acids in foods and beverages, *Journal of Chromatography A*, 1995, Vol. 705, 195 - 203
- [55] SHUI, G., LEONG, L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by HPLC, *Journal of Chromatography A*, 2002, Vol. 977, 89 - 96
- [56] SOYER, Y., KOCA, N., KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grape juices, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, Vol. 16, 629 - 636

- [57] *Biogenic Amines and Acid Metabolites – MDTM Mobile Phase*, ESA-Technical note, [on line]. [citováno 25.7.2009] Dostupné z www: http://www.esainc.com/docs/spool/70-1689P_MDTM_Phase.pdf
- [58] MATO, I., SUÁREZ-LUQUE, S., HUIDOBRO, J.F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines, *Food Research International*, 2005, Vol. 38, 1175 - 1188
- [59] KEREM, Z., BRAVDO, B., SHOSEYOV, O., TUGENDHAFT, Y., Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must, *Journal of Chromatography A*, 2004, Vol. 1052, 211 – 215
- [60] *Problémy v HPLC*, [on line]. [citováno 25.7.2009] Dostupné z www1: http://www.hplc.cz/Faq/100_water.htm
- [61] *UV-VIS HPLC detektory*, [on line]. [citováno 26.7.2009] Dostupné z www: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html
- [62] *Fluorescenční detektory*, [on line]. [citováno 26.7.2009] Dostupné z www: http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.htm
- [63] *Separáční metody v analytické chemii*, [on line]. [citováno 26.7.2009] Dostupné z www: http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm
- [64] *Základy hmotnostní spektrometrie*, [on line]. [citováno 26.7.2009] Dostupné z www: http://webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Imunologie_imunochemie/Prednasky/Prednasky_Henrychova/Zaklady_hmotnostni_spektrometrie.pdf

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------------------|--|
| rH ₂ O | Redestilovaná voda |
| Met-OH | Metanol |
| HPLC | High Performance (Pressure) Liquid Chromatography, Vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| HPLC-ECD | High Performance Liquid Chromatography with electrochemical detector, Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí |
| SH | Sohlet-Henkel, vyjádření titrační kyselosti |
| T | Thörner, vyjádření titrační kyselosti |
| E 296 | DL-jablečná kyselina |
| E 334 | L(+) vinná kyselina |
| LC | Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie |
| GC | Gas Chromatography, plynová chromatografie |
| PC | Paper Chromatography, papírová chromatografie |
| TLC | Thin Layer Chromatography, chromatografie na tenké vrstvě |
| LSC | Liquid-Solid Chromatography, adsorpční chromatografie |
| LLC | Liquid-Liquid Chromatography , rozdělovací chromatografie |
| GPC | Gel permeation chromatography, gelová permeační chromatografie |
| IEC | Ion Exchange <i>Chromatography</i> , ionexová chromatografie |
| UV-VIS | Spektrofotometrický detektor |
| FLC | Fluorescenční detektor |
| ECD | Elektrochemický detektor |
| RI | Refraktometrický detektor |
| IR | Infračervený detektor |
| MS | Hmotnostní spektrometr |
| RP-HPLC | Kapalinová chromatografie na reverzních fázích |

| | |
|------|---|
| C18 | oktadecyl |
| C8 | oktyl |
| DAD | Diode-array Detector, detektor diodového pole |
| EDTA | Etylendiamimotetraoctová kyselina |
| MDTM | Mobilní fáze pro stanovení biogenních aminů a kyselých metabolitů |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. č. 1 - Reakce na karbonylové skupině | 12 |
| Obr. č. 2 - Kyselina vinná získaná přímo z vinného moštu - nečištěná a komerčně | 22 |
| Obr. č. 3 - Schéma separace na koloně | 23 |
| Obr. č. 4 - Schéma kapalinového chromatografu HPLC [37] | 26 |
| Obr. č. 5 – Dávkovací ventil | 27 |
| Obr. č. 6 - Schéma chromatografické kolony [39] | 27 |
| Obr. č. 7 - Schéma RP-HPLC | 29 |
| Obr. č. 8 - Reakce chemického zakotvení stacionární fáze [41]..... | 30 |
| Obr. č. 9 - Účinnost elektrochemické reakce v závislosti na průtoku mobilní fáze [47]..... | 31 |
| Obr. č. 10 - Schéma coulometrické detekce [45]..... | 32 |
| Obr. č. 11 – Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 39 |
| Obr. č. 12 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 40 |
| Obr. č. 13 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = - 500 mV, E2 = - 600 mV..... | 41 |
| Obr. č. 14 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 42 |
| Obr. č. 15 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = - 400 mV, E2 = - 500 mV..... | 42 |
| Obr. č. 16 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 44 |
| Obr. č. 17 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mobilní fáze 2, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 45 |

| | |
|--|----|
| Obr. č. 18 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 46 |
| Obr. č. 19 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Ascentis TM C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 47 |
| Obr. č. 20 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 49 |
| Obr. č. 21 - Odezva mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV | 49 |
| Obr. č. 22 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 50 |
| Obr. č. 23 - Stanovení kyseliny jablečné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 52 |
| Obr. č. 24 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 1, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 54 |
| Obr. č. 25 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 3, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 100 mV, E2 = 200 mV..... | 55 |
| Obr. č. 26 - Stanovení kyseliny vinné, koncentrace 500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, mobilní fáze 4, kolona Discovery C18, průtok mobilní fáze 0,9 ml.min^{-1} , při nastavení detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV..... | 56 |
| Obr. č. 27 – Ideální chromatogram..... | 74 |
| Obr. č. 28 – Šum a drift základní linie..... | 76 |
| Obr. č. 29 – Schéma DAD detektoru..... | 77 |
| Obr. č. 30 – Schéma refraktometrického detektoru..... | 78 |
| Obr. č. 31 - Schéma fluorescenčního detektoru..... | 78 |
| Obr. č. 32 – Schéma hmotnostního spektrometru..... | 79 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tab.č. 1: Obsah kyseliny jablečné v různých druzích ovoce a zeleniny [21]..... | 18 |
| Tab.č. 2: Obsah kyseliny vinné v různých druzích ovoce a zeleniny [21]..... | 21 |
| Tab.č. 3: Vlastnosti některých detektorů | 28 |
| Tab.č. 4: Možnosti stanovení kyseliny jablečné a vinné pomocí HPLC | 33 |
| Tab.č. 5: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Ascentis™ C18 | 38 |
| Tab.č. 6: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Ascentis™ C18 | 39 |
| Tab.č. 7: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Ascentis™ C18 | 41 |
| Tab.č. 8: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Ascentis™ C18 | 43 |
| Tab.č. 9: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Ascentis™ C18 | 44 |
| Tab.č. 10: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Ascentis™ C18 | 45 |
| Tab.č. 11: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Ascentis™ C18 | 46 |
| Tab.č. 12: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18 | 48 |
| Tab.č. 13: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18 | 50 |
| Tab.č. 14: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny jablečné na koloně Discovery C18 | 51 |
| Tab.č. 15: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18 | 53 |
| Tab.č. 16: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18 | 54 |
| Tab.č. 17: Podmínky detekce a charakter odezvy pro stanovení kyseliny vinné na koloně Discovery C18 | 55 |

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Základní chromatografické pojmy

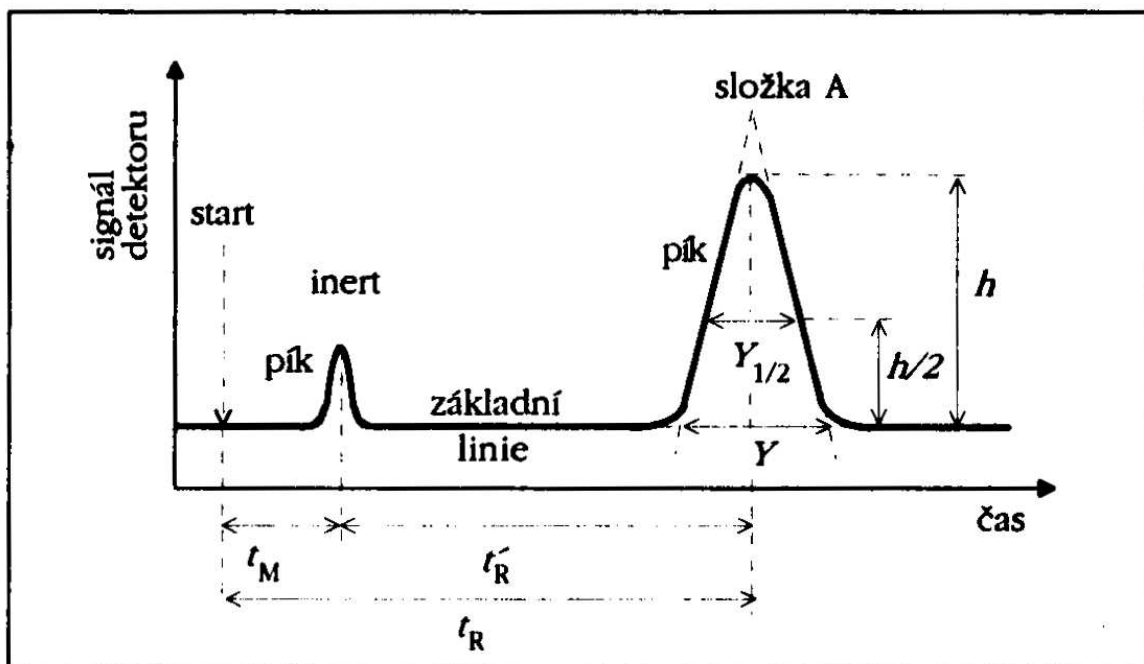
Příloha P II: Základní principy detektorů pro HPLC

Příloha P III: Chromatogramy získané při UV - detekci

Příloha P IV: Tamaryšek indický

PŘÍLOHA P I: ZÁKLADNÍ CHROMATOGRAFICKÉ POJMY

Cílem vysokoúčinné kapalinové chromatografie je optimální rozdělení nejméně dvou složek v přijatelném čase tak, aby se vymyly do detektoru jako samostatné koncentrační zóny s gaussovským rozdělením koncentrace složek [35].



Obr. č. 27 – Ideální chromatogram; t_R – retenční čas, t_M – mrtvý retenční čas, t'_R – redukovaný retenční čas, h – výška píku, Y – šířka píku v základně, $Y/2$ – výška píku v polovině výšky

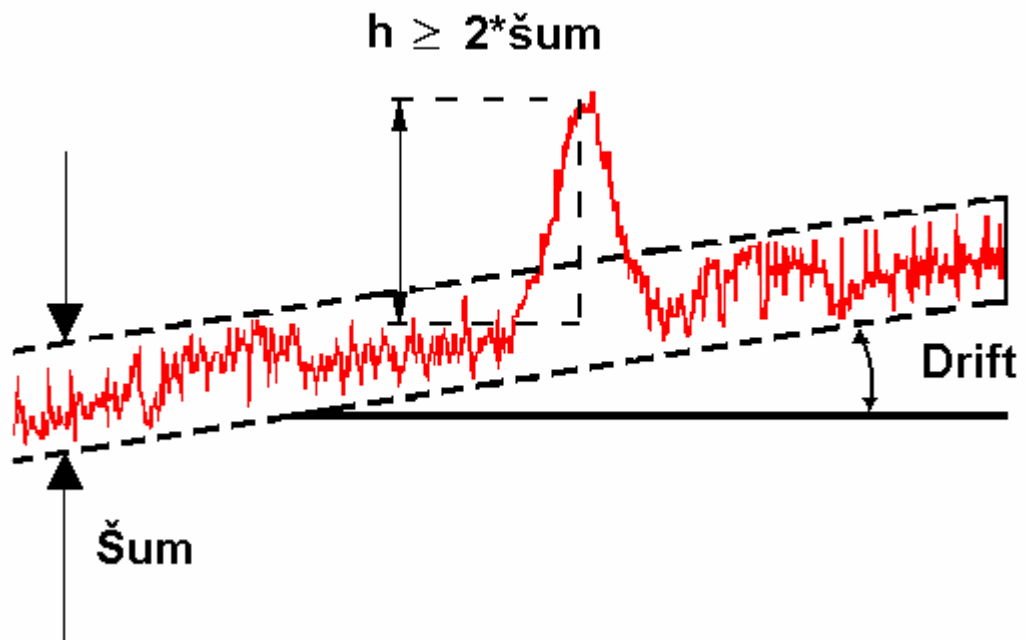
- **Retenční čas (t_R)** – celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně. Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvá v mobilní fázi - mrtvý retenční čas (t_M) a redukovaný retenční čas (t'_R), čas odpovídající pobytu ve stacionární fázi. Retenční čas pak odpovídá retenční rovnici : $t_R = t_M + t'_R$

Pro inert, který se nepoutá ve stacionární fázi a putuje stejnou rychlostí jako mobilní fáze, je retenční čas totožný s mrtvým retenčním časem. Vynásobíme-li retenční čas objemovým průtokem (F_m) získáme retenční objem (V_R) [33].

- **Mrtvý objem kolony** – závisí na rozměrech kolony, způsobu uložení náplně a pórovitosti náplně. Lze zapsat: $V_M = t_R \cdot F_m$
- **Plocha píku** – ohraničená křivkou a nulovou linií určuje množství, koncentraci analytu. Pomocí plochy píky vyhodnocujeme kvantitativní informace.

- **Rozlišení (R_s)** – rozlišovací faktor, je nejlepším kritériem pro posouzení dělení dvou látek. Dvojice látek 1 a 2 se definuje poměrem rozdílu jejich retenčních časů a součtu polovičních šířek píků.
$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \cdot (Y_1 + Y_2)} = \frac{\Delta t_R}{4\sigma}$$
- **Účinnost chromatografické kolony** – charakterizuje její schopnost separovat složky směsi. Čím je kolona účinnější, tím lépe dokáže od sebe složky oddělit. Mírou účinnosti chromatografické kolony je počet teoretických pater (n) a výškový ekvivalent teoretického patra (H). Teoretické patro je pomyslná část kolony, kde dochází k ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra. Kolona je účinnější, čím více je teoretických pater. Každé zvýšení jejich počtu má za následek prodloužení analýzy.
- **Rozdělovací koeficient (K_D)** – platí především pro dvě nemísitelné fáze, kde jedna je zakotvena ve formě filmu na pevném nosiči. Pohybem mobilní fáze dochází k neustálému porušování a novému ustalování rovnováhy podle rozdělovacího koeficientu. U látek s rozdílnou hodnotou K_D dochází takto k dělení na principu polární a nepolární interakce. Rozdělovací koeficient lze vyjádřit vztahem: $K_D = \frac{c_s}{c_m}$, kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace v příslušných fázích, K_D je za dané teploty konstantní.
- **Kapacitní poměr (k)** – je definován jako množství separované látky ve stacionární a mobilní fázi. Kapacitní poměr vyjadřuje kapacitu kolony. Vysoký kapacitní poměr je nevýhodný, protože eluční objemy jsou velké, doba analýzy dlouhá a zóny eluovaných látek jsou rozmyté [33] [35].
- **Šum**– šum je kolísání odezvy detektoru, které pochází z periodických změn systému. Jedná se o krátkodobou změnu základní linie, která může být způsobena změnou elektrického signálu, nestabilitou lampy detektoru, teplotními výkyvy či jinými faktory. Šum je faktor, který určuje citlivost detektoru. Výška prokazatelně detekovatelného píku musí být dvojnásobek šumu základní linie, ke kvalitativnímu určení se bere výška trojnásobku šumu základní linie a ke kvantitativnímu určení výška desetinásobku šumu.

- **Drift** – představuje dlouhodobou nestabilitu základní linie, lze popsat se jako průměrný sklon základní linie.

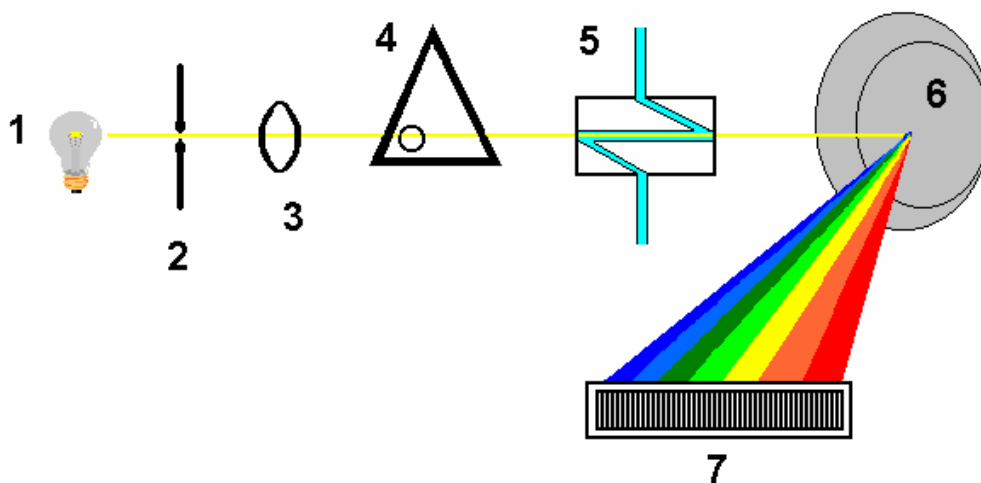


Obr. č. 28 – Šum a drift základní linie

- **Mez detekce** – odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky odlišitelný od šumu. Podle uzančních podmínek se obvykle za mez detekce považuje trojnásobek šumu základní linie.
- **Mez stanovitelnosti** – je taková koncentrace, při které je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Podle uzance se mez stanovitelnosti vyjadřuje jako desetinásobek šumu základní linie.

PŘÍLOHA P II: ZÁKLADNÍ PRINCIPY DETEKTORŮ PRO HPLC

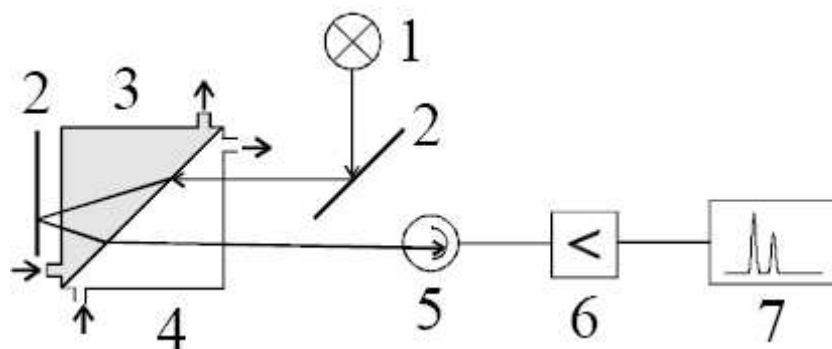
- **Fotometrické detektory** – patří k nejběžnějším detektorům a jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190 – 800 nm. Konstrukčně můžeme rozlišit detektory s fixní vlnou délkou (254 nm – rtuťová výbojka), s měnitelnou, ale předem danou vlnovou délkou, detektory s programovatelnou vlnou délkou v rozmezí 190 – 700 nm a detektory diodového pole (DAD, PDA). Detektory diodového pole jsou v této skupině nejdokonalejší, snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli, který se pohybuje v rozmezí 512 – 1024 diod.



Obr. č. 29 – Schéma DAD detektoru; 1 – zdroj záření, 2 – štěrbinu, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela, 6 – holografická mřížka, 7 - fotodiody

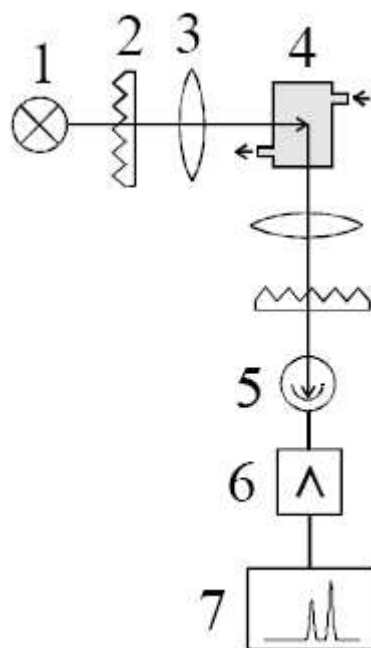
Záření ze zdroje prochází štěrbinou, čočkou a clonou přes měrnou celu se vzorkem. Světlo se po dopadu na holografickou mřížku spektrálně rozkládá a na fotodiody dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru [61].

- **Refraktometrický detektor (RI)** – měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se vychylka. Tento typ detektoru není příliš citlivý, ale je velmi univerzální. Při jeho použití je nutné důsledně dodržovat konstantní teplotu [33].



Obr. č. 30 – Schéma refraktometrického detektoru; 1 - zdroj světla, 2 – zrcadlo, 3 – měrná cela, 4 – referentní cela, 5 – fotonásobič, 6 – zesilovač, 7 – zapisovač

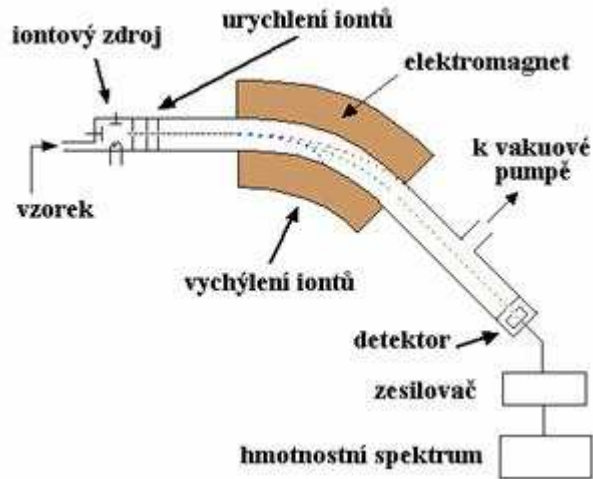
- **Fluorescenční detektor (FI)** – jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního (emisního) záření, které látka vydá po absorpci excitačního záření. Absorbicí elektromagnetického záření přechází molekuly ze singletového do excitovaného elektronového stavu a při přechodu zpět do základního stavu vyzáří energii ve formě fluorescence [62].



Obr. č. 31 - Schéma fluorescenčního detektoru; 1 – světelný zdroj, 2 – monochromátor, 3 – čočka, 4 – měrná cela, 5 – fotonásobič, 6 – zesilovač, 7 - zapisovač

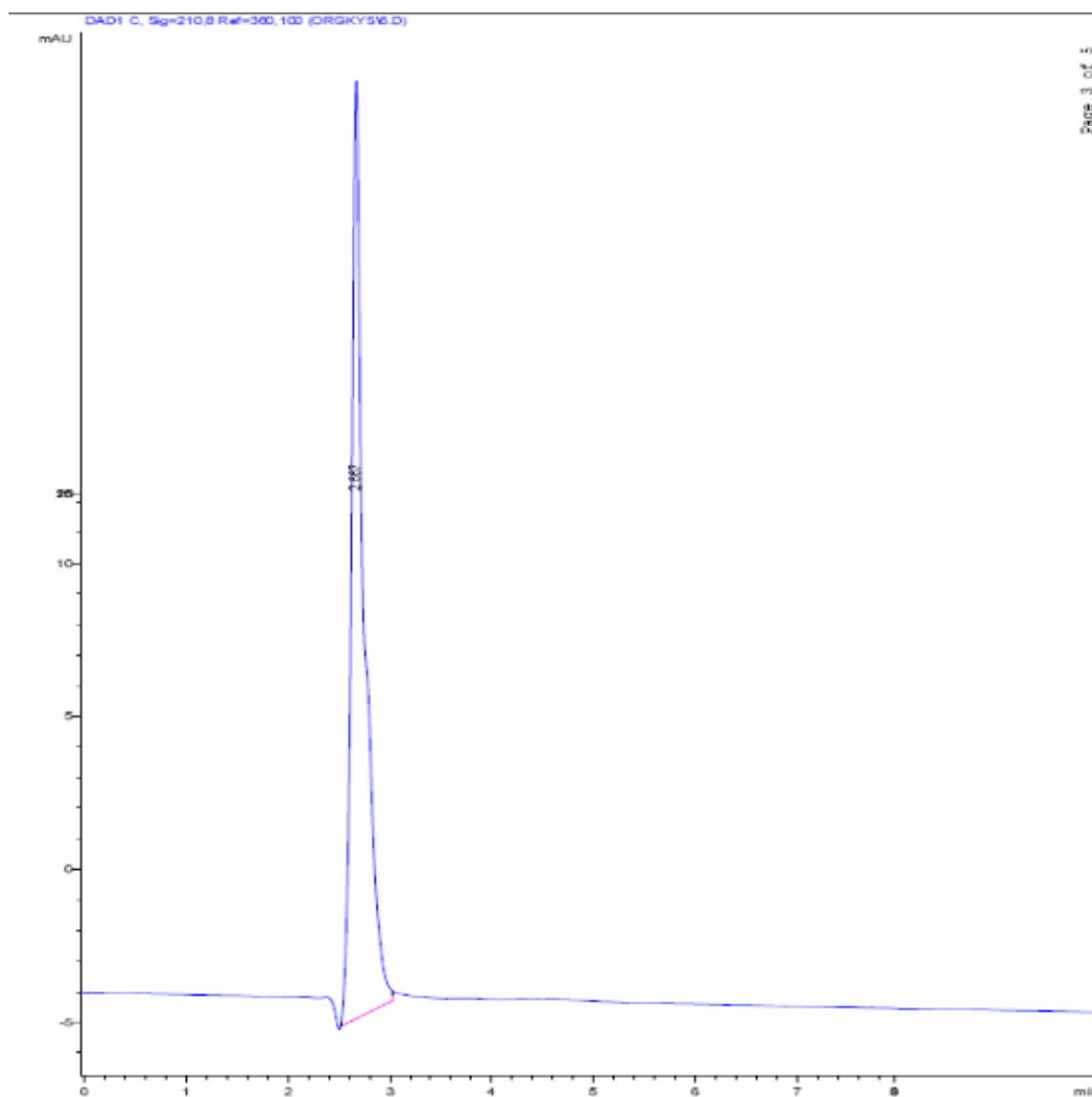
- **Infračervený detektor (IR, FTIR)** – je univerzální detektor, zpracovávají se spektra složek v mobilní fázi. Použití IR detektorů je omezené, využití nachází detektor na bázi IR spektrometru s Fourierovou transformací [33] [63].

- **Hmotnostní spektrometr (MS)** – určuje hmotnosti atomů, molekul nebo molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. MS vypovídá o primární struktuře analyzované látky. Hmotnostní spektrometry pracují za hlubokého vakua. Iontový zdroj slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu. V současnosti existuje celé řada iontových zdrojů (ionizace chemická, nárazem elektronů, elektrickým polem...), které značně rozšířily možnosti využití MS [63] [64].

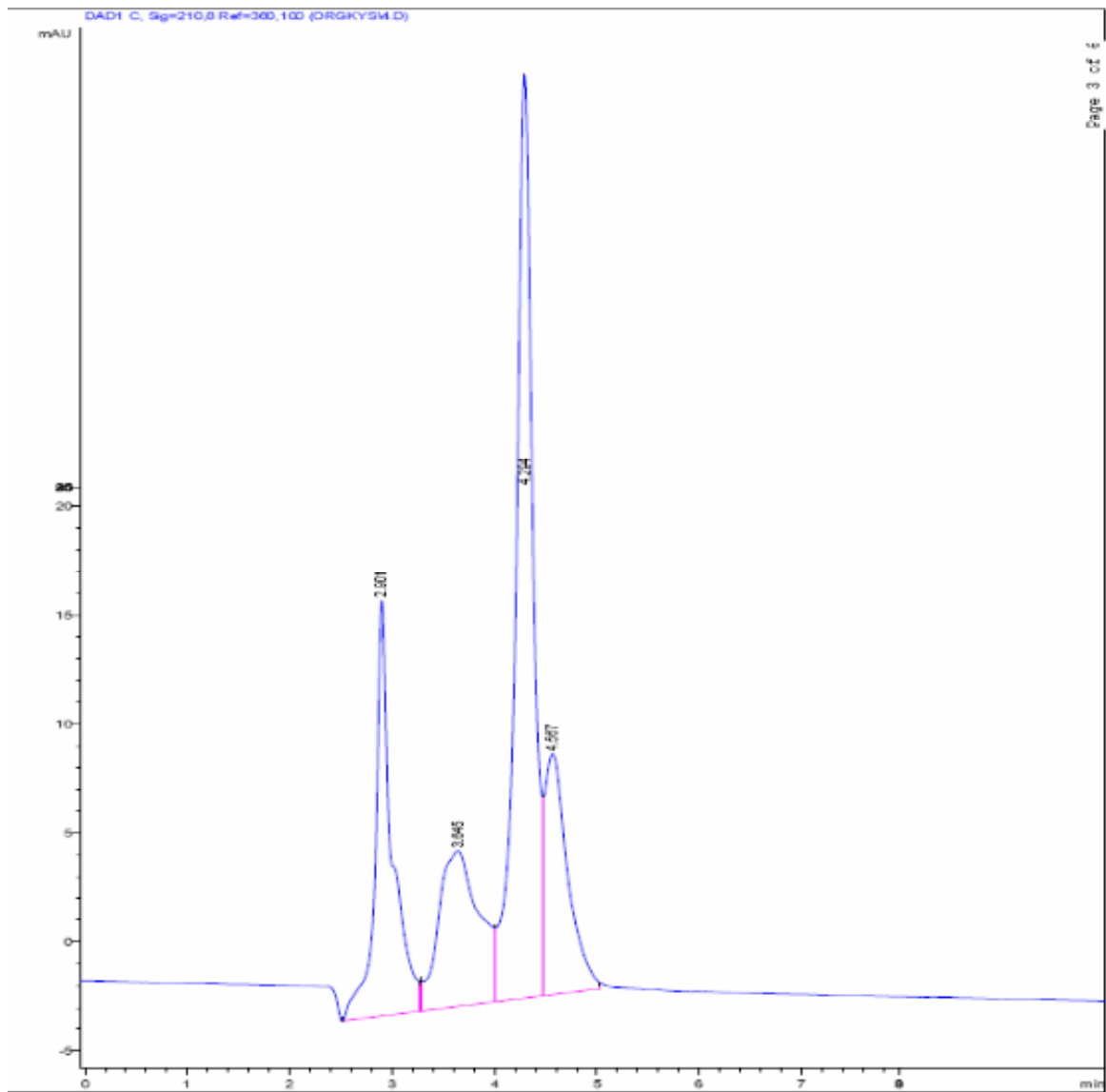


Obr. č. 32 – Schéma hmotnostního spektrometru

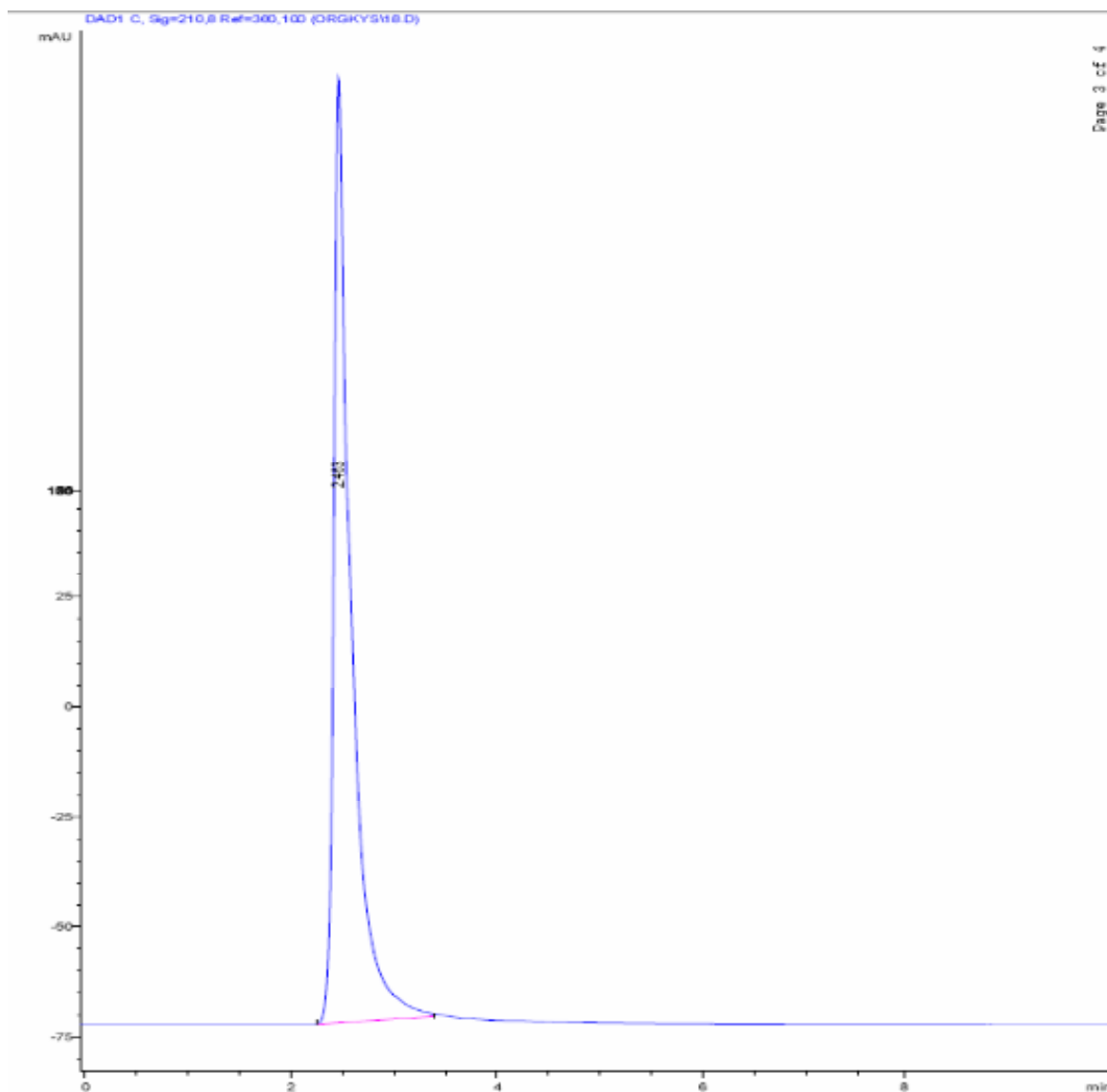
PŘÍLOHA P III: CHROMATOGRAMY ZÍSKANÉ PŘI UV DETEKCI



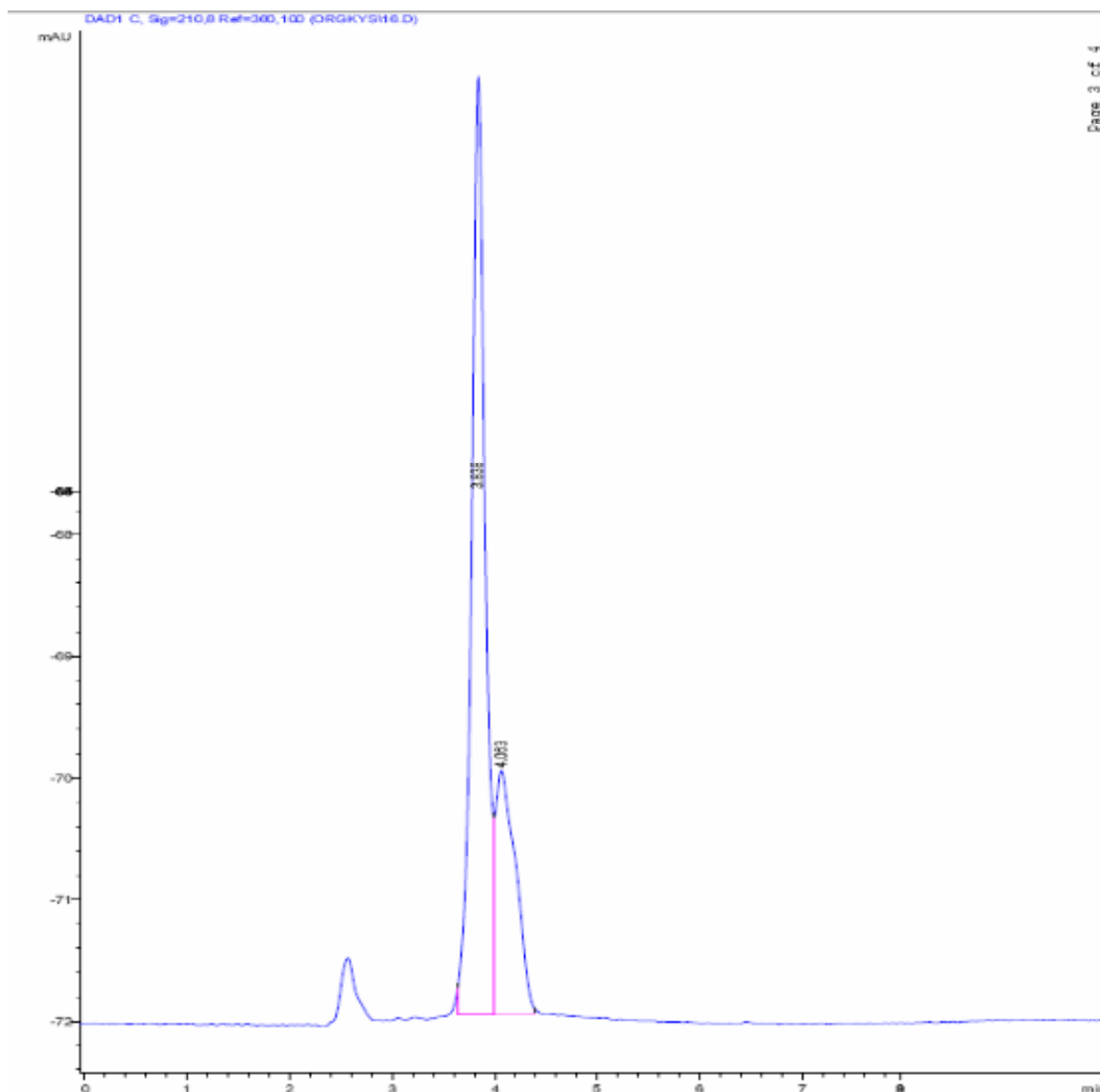
Obr. č. 33 – Kyselina vinná ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\lambda = 210 \text{ nm}$, Supelcosil LC 8, průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Obr. č. 34 - Kyselina jablečná ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\lambda = 210 \text{ nm}$, Supelcosil LC 8, průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Obr. č. 35 – Kyselina šťavelová ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\lambda = 210 \text{ nm}$, Supelcosil LC 8, průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Obr.č. 36 – Kyselina jantarová ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), $\lambda = 210 \text{ nm}$, Supelcosil LC 8, průtok mobilní fáze $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota $25 \text{ }^\circ\text{C}$

PŘÍLOHA P IV: TAMARYŠEK (TAMARIND) INDICKÝ



Tamaryšek (Tamarind) indický (*Tamarindus indica*) je středně vysoký strom (do 20 m), původem z Indie a afrických tropických oblastí, plodem je světle hnědý lusk (až 20 cm) se 4 – 12 jádry, které jsou obklopené hnědočervenou kašovitou hmotou. Chuť je sladkokyselá, obsahuje také hodně vlákniny, železa a vitamínu C.