

# Možnosti stanovení kyseliny citronové a octové metodou HPLC

Bc. Ivana Krausová

---

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. Ivana KRAUSOVÁ**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
  
Téma práce: **Možnosti stanovení kyseliny citronové a octové metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Charakteristika organických kyselin
- Možnosti stanovení organických kyselin – metoda HPLC

### II. Praktická část

- Metodika stanovení kyseliny citronové a octové
- Zpracování výsledků a diskuse

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

[2] KALAČ, P. Chemie potravin pro obchodně podnikatelský obor, České Budějovice Jihočeská univerzita, 1999.

[3] KLOUDA, P. Moderní analytické metody, Ostrava 2003.

[4] DOUŠA, M. Základy separačních metod se zaměřením na HPLC, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2002.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Helena Kadidlová**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**18. 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

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat, jako jedny z nejvýznamnějších organických kyselin kyseliny citronovou a octovou a vytvořit vhodnou metodiku pro stanovení těchto kyselin pomocí HPLC-ECD. Z výsledků měření se pro stanovení kyseliny citronové jeví jako nejvhodnější použití kolony ASCENTIS C18 a mobilní fáze tvořené z kyseliny fosforečné, metanolu a redestilované vody v poměru 30 : 1 : 69. Pro stanovení kyseliny octové se jeví jako neoptimálnější stejné podmínky jako u kyseliny citronové.

Klíčová slova: Organické kyseliny, kyselina citronová, kyselina octová, HPLC-ECD, podmínky stanovení

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to characterize citric acid and acetic acid as organic acids and to evaluate convenient method of determination of these acids, by using HPLC-ECD.

For determination of citric acid seem ASCENTIS C18 and mobile phase, made up from phosphoric acid, methanol, and redistilled water in proportion 30 : 1 : 69, as the most convenient. The same conditions seemed to be the most suitable also for determination of acetic acid.

Keywords: organic acids, citric acid, acetic acid, HPLC-ECD, conditions of determination

Poděkování, motto:

Touto formou bych chtěla poděkovat Ing. Heleně Kadidlové a Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za pomoc a odborné vedení v celém průběhu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za všestrannou podporu během mého studia.

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**

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 ORGANICKÉ KYSELINY</b> .....	<b>10</b>
1.1 VÝSKYT ORGANICKÝCH KYSELIN .....	11
1.2 VYUŽITÍ ORGANICKÝCH KYSELIN .....	11
1.2.1 Přidatné látky.....	12
1.2.2 Konzervace.....	13
1.3 KYSELINA CITRONOVÁ (2-HYDROXY-1,2,3-PROPANTRIKARBOXYLOVÁ) .....	15
1.3.1 Výskyt .....	16
1.3.2 Výroba.....	17
1.3.3 Využití.....	17
1.3.4 Význam pro člověka.....	17
1.4 KYSELINA OCTOVÁ (ETHANOVÁ KYSELINA) .....	18
1.4.1 Výskyt .....	18
1.4.2 Výroba.....	19
1.4.3 Využití.....	19
1.4.4 Vliv na člověka.....	20
<b>2 CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>21</b>
2.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE – HPLC.....	22
2.1.1 Základní pojmy.....	24
2.1.2 Mobilní fáze .....	24
2.1.3 Stacionární fáze .....	24
2.1.4 Uspořádání kapalinového chromatografu .....	25
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>3 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>36</b>
3.1 PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ A VZORKŮ PRO ANALÝZU .....	36
3.1.1 Příprava mobilní fáze 1 .....	36
3.1.2 Příprava mobilní fáze 2 .....	36
3.1.3 Příprava mobilní fáze 3 .....	36
3.1.4 Příprava měřených vzorků.....	37
3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	37
3.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	37
3.4 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY .....	38
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>39</b>
4.1 MOŽNOSTI DETEKCE KYSELINY CITRONOVÉ A OCTOVÉ NA KOLONĚ ASCENTIS C18 POMOCÍ ECD .....	39
4.1.1 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 1 .....	39
4.1.2 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 2 .....	43
4.1.3 Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 1 .....	45

4.1.4	Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 2.....	48
4.2	MOŽNOSTI DETEKCE KYSELINY CITRONOVÉ A OCTOVÉ NA KOLONĚ DISCOVERY C18 POMOCÍ ECD.....	50
4.2.1	Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 1 .....	50
4.2.2	Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 1 .....	51
4.2.3	Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 3 .....	55
4.2.4	Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 3.....	56
4.3	MOŽNOSTI DETEKCE KYSELINY CITRONOVÉ A OCTOVÉ NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 POMOCÍ UV-VIS .....	57
4.4	DISKUSE .....	58
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>69</b>

## ÚVOD

Kyseliny citronová a octová jsou řazeny mezi organické kyseliny. Organické kyseliny se vyskytují v ovoci a zelenině. Tyto kyseliny nacházejí uplatnění při zpracování potravin a usnadňují jejich konzervaci. Při výrobě potravin jsou organické kyseliny využívány také jako přídavné látky, což jsou takové, které se nevyužívají jako samostatná potraviny, ani jako přísada, ale jsou do potravin přidávány při výrobě, balení, přepravě či skladování a tím se stávají její součástí a na obalu výrobku jsou označeny tzv. E kódem. Organické kyseliny se využívají také jako konzervační látky. Kyselina octová může být pro konzervaci použita samotná nebo v kombinaci s jinými chuťovými složkami, např. solí.

Metoda HPLC je jednou z chromatografických metod, jejíž výhodou je široká oblast použitelnosti, nejen pro stanovení kyselin.

V rámci literární rešerše bylo zjištěno, že vhodné podmínky pro stanovení organických kyselin v alkoholických a nealkoholických nápojích jsou použití mobilní fáze tvořené z kyseliny fosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), metanolu ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) a redestilované vody ( $\text{rH}_2\text{O}$ ) v poměru 30 : 1 : 69, dále mobilní fáze složené z kyseliny fosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), metanolu ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) a redestilované vody ( $\text{rH}_2\text{O}$ ) v poměru 0,5 : 99 : 0,5 a použití kolon C18. Vzhledem k přístrojovému vybavení laboratoře byla zvolena metoda stanovení HPLC-ECD s použitím kolon ASCENTIS C18 a DISCOVERY C18.

Hlavním úkolem této práce bylo vytvoření vhodné metodiky pro stanovení kyseliny citronové a octové metodou HPLC-ECD.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 ORGANICKÉ KYSELINY

Organické sloučeniny mající vlastnosti kyselin nazýváme organické kyseliny. Organická sloučenina je látka složená z jednoho druhu molekul, přičemž tyto molekuly obsahují vždy jeden nebo více atomů uhlíku. Kromě toho mohou obsahovat i atomy dalších prvků, především vodíku, ale i kyslíku, dusíku, síry, fosforu a jiných prvků. Nejběžnějšími organickými kyselinami jsou karboxylové kyseliny, jejichž kyselost je způsobena karboxylovou skupinou – COOH [1]. Karboxylové kyseliny jsou běžnou složkou hlavně rostlinných surovin, u kterých výrazně ovlivňují hodnotu pH a tím také jejich údržnost vůči mikrobiálním změnám, technologické a sensorické vlastnosti, zejména chuť [2]. Podle počtu karboxylových skupin dělíme tyto kyseliny na:

- monokarboxylové, které obsahují jednu vázanou karboxylovou skupinu (kyselina mravenčí, octová, propionová atd.),
- dikarboxylové, obsahující dvě karboxylové skupiny (kyselina šťavelová, malonová, jantarová atd.),
- polykarboxylové, obsahující několik karboxylových skupin.

Dalším možným kritériem dělení je charakter uhlovodíkového zbytku. Podle něj rozlišujeme:

- nasycené kyseliny – uhlovodíkový zbytek obsahuje pouze jednoduché vazby,
- nenasycené kyseliny – uhlovodíkový zbytek obsahuje násobné vazby,
- aromatické kyseliny – karboxylová skupina je vázaná na aromatický systém [3].

Řada karboxylových kyselin obsahuje současně další funkční skupiny, např. karbonylovou skupinu (oxokyseliny, resp. aldehydokyseliny nebo ketokyseliny), aminoskupinu (aminokyseliny), hydroxylovou skupinu (hydroxykyseliny) [4].

Organické kyseliny se mohou dělit také podle způsobu jejich výroby na mikrobiální a syntetické. Při výrobě organických kyselin mikrobiologickými procesy jsou hlavními producenty bakterie a plísně. Mezi organické kyseliny produkované bakteriemi patří kyselina octová, mléčná, propionová a máselná. Ke kyselinám produkovaným plísněmi se řadí kyselina citronová, glukonová, šťavelová a fumarová. Organické kyseliny vyrobené mikrobiologicky lze dle využití rozdělit do dvou skupin:

- kyseliny vyrobené pro potravinářské účely, které ovšem lze využít i v jiných průmyslech,
- kyseliny vyrobené pro jiné než potravinářské účely [5].

## 1.1 Výskyt organických kyselin

Organické kyseliny, které tvoří převážnou část kyselin obsažených v ovoci a zelenině, jsou velmi četné a chemicky rozdílné. Vyskytují jako přirozené složky potravin. Patří mezi slabé až středně silné, většinou jedno- nebo vícesytné, alifatické, zřídka aromatické kyseliny. Jsou zastoupeny ve formě volných kyselin, solí, nebo jsou vázané s jinými sloučeninami [6].

Ovoce bývá až na některé výjimky např. přezrálé hrušky, třešně, broskve, velmi kyselé. pH šťávy se pohybuje okolo hodnoty 4 a nejvíce kyselin má ovoce v době před dozráním. pH šťávy získané z hrušek, třešní nebo broskví může vystoupit k hodnotě 4,5 a u přezrálých bezinek může vzrůst pH na hodnotu 4,7 [7]. Obsah organických kyselin v různých druzích ovoce se pohybuje v rozmezí 10 - 30 g.kg<sup>-1</sup>. Více kyselin obsahují citrusové plody a černý rybíz. V jádrovém a peckovém ovoci převažuje kyselina jablečná, v bobulovitém a citrusovém ovoci kyselina citronová, v hroznech vinné révy je nejvíce zastoupena kyselina vinná [8].

Ve srovnání s ovocem je čerstvá zelenina na kyseliny velmi chudá, proto je řazena mezi technologicky málo kyselé potraviny [9]. pH zeleniny se pohybuje v rozmezí od 5,5 do 6,6. Výjimkou je reveň, jejíž pH je kolem 3,2. Poměrně kyselé jsou také rajčata. Obsah kyselin v čerstvé zelenině se pohybuje nejčastěji mezi 2 - 4 g.kg<sup>-1</sup>.

Maso a jiné živočišné produkty jsou v čerstvém stavu ještě méně kyselé než zelenina (pH 6,6 - 7,2). Za nekyselou potravinou je považován například bílek slepičích vajec, jehož pH roste z hodnoty 7,5 až na hodnotu 9 [4].

## 1.2 Využití organických kyselin

Kyseliny se při zpracování potravin uplatňují v mnoha směrech – sladkým potravinám, převážně ovoci dodávají jejich typickou chuť, uplatňují se i jako bakteriostatický činitel, který značně usnadňuje konzervaci ovoce a uměle okyselených potravin [7]. Uplatňují se tedy zejména jako složky chuťové, aktivátory různých trávicích

enzymů nebo i jako činitelé ovlivňující nemikrobiální procesy. V mase se uplatňují hlavně při procesu zrání. Při úpravě ovoce se setkáváme s tzv. ovocnými kyselinami, jako jsou kyselina jablečná, citronová a vinná.

Kyselost potravin bývá vyjadřovaná jako titrační (vyjádřena jako nejvíce zastoupená kyselina v potravine) nebo aktivní (vyjádřená hodnotou pH) [10]. Z technologického hlediska se potraviny dělí dle kyselosti na:

- technologicky kyselé (  $\text{pH} < 4$ ),
- technologicky málo kyselé ( $\text{pH} 4,0 - 6,5$ ),
- technologicky nekyselé ( $\text{pH} > 6,5$ ) [9].

V praxi se můžeme setkat i s jiným slovním pojmenováním těchto tří skupin, přičemž hraniční hodnoty pH jsou vždy stejné [4], [10].

### 1.2.1 Přidatné látky

Organické kyseliny využíváme vzhledem k jejich použití při výrobě potravin jako přidatné látky. Ty jsou definovány jako látky, které se bez ohledu na jejich výživovou hodnotu nepoužívají samostatně jako potravina, ani jako charakteristická potravní přísada. Přidávají se do potravin při výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy stávají součástí potraviny. Tyto látky musí být na obalu výrobku označeny názvem nebo číselným E kódem a názvem kategorie, do které patří [11]. Z organických kyselina má označení E330 kyselina citronová, kyselina vinná E334, kyselina mléčná E270, kyselina octová E260, kyselina jablečná E296 a jantarová E363. Podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR č. 304/2004 mohou být přidatné látky povolené jen za předpokladu že:

- je prokázána jejich technologická potřeba a účelu nelze dosáhnout jinými ekonomickými nebo technologickými prostředky,
- v navrhovaných množstvích nepředstavují žádné zdravotní riziko pro spotřebitele,
- nemohou uvádět spotřebitele v omyl.

Přidatné látky lze použít pouze tehdy, pokud je jisté, že jejich přidání do potravin bude prokazatelně prospěšné pro spotřebitele. Proto by měly být použity pro následující účely:

- zachování výživové hodnoty potravin; úmyslné snížení výživové hodnoty potravin je oprávněné jen, když potravina nepředstavuje podstatnou položku běžné stravy nebo pokud je použití přídavné látky nezbytné pro výrobu potravin určených pro zvláštní výživu,
- dodání potřebných přísad nebo složek do potravin určených pro zvláštní výživu,
- zvýšení trvanlivosti potravin nebo zlepšení jejich organoleptických vlastností za předpokladu, že se tím nezmění charakter, složení nebo jakost potravin, aby nemohl být spotřebitel uveden v omyl,
- pomoci při výrobě, zpracování, přepravě, úpravě, balení, dopravě nebo skladování potravin za předpokladu, že přídavná látka nesmí být použita k zakrytí závadných surovin nebo nedodržení správné hygienické praxe [12].

### 1.2.2 Konzervace

Konzervací potravin je myšlený každý úmyslný zákrok, případně úprava potravin, která prodlužuje skladovatelnost suroviny déle než je její přirozená údržnost. Rozlišujeme dva typy výrobků podle doby, o kterou lze prodloužit jejich trvanlivost. Jako konzervy jsou označovány výrobky, které mají proti mikroorganizmům téměř neomezenou trvanlivost, kdežto výrobky, jejichž trvanlivost je zvýšená pouze na určitou dobu, nejdéle půl roku za příznivých skladovacích podmínek, jsou označovány jako polokonzervy [7].

Mimo prodloužení trvanlivosti potravin je důležité i zachování nutričních složek (vitamínů) a základních vlastností konzervované potravin. Jedná se např. o zachování barvy, vůně, chuti, nebo také o dosažení nejlepšího možného vzhledu konzerv a polokonzerv.

Pro ochranu potravin před rozkladnými činnostmi mikroorganizmů obecně platí, že intenzita rozkladných procesů  $R$  v určitém prostředí je přímo úměrná virulenci, schopnosti mikroorganizmů vyvolávat infekci a počtu mikroorganizmů, nepřímo úměrná je ve vztahu k odolnosti prostředí. Toto pravidlo je možné zapsat pomocí vzorce:

$$R = \frac{\text{počet mikroorganizmů} \cdot \text{virulence}}{\text{odolnost prostředí}}$$

Princip konzervačních metod spočívá v potlačení činitelů uvedených v čitateli zlomku, nebo posílení činitele ve jmenovateli [7]. Obecně je možné konzervační metody rozdělit do tří následujících skupin:

1. Vylučování mikroorganismů z prostředí
  - omezování kontaminace potravin mikroorganismy,
  - ochuzování potravin o mikroorganismy během zpracování,
  - úplné vylučování mikroorganismů z prostředí.
2. Přímá inaktivace mikroorganismů (usmrcování mikroorganismů, sterilace potravin)
  - fyzikální zákroky,
  - chemické zákroky.
3. Nepřímá inaktivace mikroorganismů
  - konzervace fyzikální, nebo fyzikálně – chemickou úpravou potravin,
  - konzervace biologickou úpravou potravin,
  - konzervace chemickou úpravou potravin [7].

### **Konzervace organickými kyselinami**

Konzervace organickými kyselinami je řazená mezi nepřímé konzervační metody. Jedná se o konzervaci chemickou úpravou potravin. Organickými kyselinami jsou míněny ty kyseliny, které se vyskytují v potravinách ve značném množství nebo jsou získány některými biologickými procesy. Použít je však můžeme jen za určitých okolností a na určitou dobu. Většina bakterií, obzvláště sporulující hnilobné bacily a clostridia, inhibuje pH nižší než 4,0 – 4,3. Naproti tomu rozvoj kvasinek a plísní inhibuje silněji okyselené prostředí. K potlačení některých mikroorganismů tedy stačí prostředí okyselit na hodnoty pH 4 a nižší. Dle schopnosti potlačení mikroorganismů jsou seřazeny jednotlivé organické kyseliny takto:

- kyselina octová,
- kyselina mléčná,
- kyselina citronová,
- kyselina vinná a jablečná.

Toto pořadí je zachováno, pokud jde o pH i o koncentraci jednotlivých kyselin. Nejúčinnější je tedy kyselina octová, která působí smrtelně na četné vegetativní formy bakterií při koncentracích 4 – 6 %. Spory však snášejí po dlouhou dobu působení 6% kyseliny octové. S klesajícím pH účinnost kyseliny octové roste. Kyselina octová použitá v chuťově snesitelných koncentracích chrání potraviny jen dočasně. Při konzervaci organickými kyselinami je proto možné využít jejich vzájemné kombinace např. současné působení kyseliny octové a mléčné nebo spolupůsobení kyseliny octové s kuchyňskou solí.

V potravinářství se konzervace okyselením spojená s dalšími chuťovými úpravami označuje jako marinování. Při konzervaci ovoce se kyselina octová nevyužívá z důvodu špatných chuťových vlastností výsledného produktu. S takovýmto způsobem úpravy ovoce se můžeme setkat hlavně při domácí úpravě např. švestky v octě. Větší využití nachází kyselina octová při konzervaci zeleniny, protože chuť zeleniny a octa se zpravidla dobře snáší. V oboru zpracování potravin živočišného původu má u nás marinování význam jedině při konzervaci ryb. Marinování ryb probíhá ve dvou fázích. V první získává rybí maso požadovanou konzistenci uzpůsobenou k požívání a ve druhé dochází k samotnému konzervování a získání požadované chuti a požadovaného vzhledu [7]. V konzervaci potravin má největší význam kyselina citronová, jablečná, mléčná, octová a vinná.

### 1.3 Kyselina citronová (2-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylová)

Kyselina citronová (citric acid), jejíž sumární vzorec je  $C_6H_8O_7$ , je nejvýznamnějším zástupcem trikarboxylových kyselin [4]. V přírodě se vyskytuje v ovoci a je využívána v potravinářském průmyslu a k přípravě léků [3].

Kyselina citronová je při pokojové teplotě bílá, krystalická látka viz (obr. 1). Vyskytuje se buď jako bezvodá nebo jako monohydrát. Bezvodá krystalizuje z horké vody, zatímco její monohydrát krystalizuje za studena. Monohydrát může být převeden na bezvodou kyselinu při 74° C. Kyselina citronová je velmi dobře rozpustná ve vodě a také se dobře rozpouští v etanolu.



Obr. 1 – Krystalická kyselina citronová [33]

### 1.3.1 Výskyt

Kyselina citronová se ve vysokých koncentracích vyskytuje v citrusových plodech. V podstatně nižším množství se nachází v běžném ovoci a zelenině. Mimo citrusové plody je obsažena v brusinkách, jahodách, ostružinách, trnkách a v menší míře i v ostatním ovoci [2], [5]. Pro názornost jsou v tabulce 1 uvedeny hodnoty obsahu kyseliny citronové ve vybraných druzích ovoce a zeleniny.

Tabulka 1 - Obsah kyseliny citronové v ovoci a zelenině [4]

Potravina - ovoce	Obsah kyseliny v mg.kg <sup>-1</sup>	Potravina - zelenina	Obsah kyseliny v mg.kg <sup>-1</sup>
jablka	75-100	rajčata	8 800-26 300
jahody	6 000-11 000	okurky	100-3 260
rybíz červený	12 000-20 200	reveň	1 350-1 370
rybíz černý	25 000-31 600	špenát	82-101
pomeranče	5 600- 9 800	zelený hrách	1 100-1 790
citrony	40 000-43 800	mrkev	340-930
banán	680	česnek	190



### 1.3.2 Výroba

Kyselina citronová je přirozenou složkou citrusového ovoce a poprvé byla izolovaná z citronové šťávy v roce 1784 [13]. Průmyslově se vyrábí kvašením melasy např. plísněmi *Aspergillus niger*, nebo se získává z citronové šťávy. Velmi dlouho byly citronové plody jediným zdrojem její výroby, která se však stala ekonomicky náročnou. Po zjištění, že některé mikroorganismy jsou schopny produkovat kyselinu citronovou a hromadit ji jako extracelulární metabolity, byla ve 30. letech 19. století postupně zaváděná kvasná výroba, která převládla a dodnes zůstala hlavní formou její výroby [14], [5]. Přesto malé množství kyseliny citronové, přibližně méně než 1 % celkové světové produkce, je produkováno z citrusového ovoce v Mexiku a Jižní Americe, kde jsou citrusy dostupné [13]. Pro výrobu kyseliny citronové je možné využívat i chemickou syntézu, která je ovšem finančně náročnější než využití mikroorganismů.

### 1.3.3 Využití

Acidulanty používané jako potravinářská aditiva jsou většinou organické kyseliny identické s látkami, které se v potravinách přirozeně vyskytují. Kyselina citronová působí jako stabilizátor barvy ve výrobcích z ovoce a modifikuje texturu (např. umožňuje vznik některých pektinových gelů) [15]. Dále se používá jako okyselující a konzervační činidlo, potlačující růst nežádoucí mikroflóry. Kyselina citronová je využívána i při deodoraci olejů, jako přísada do nealkoholických nápojů, kterým dodává kyselou, chladivou a osvěžující příchut', do různých konzervářských výrobků a pro další účely [4].

Přibližně 70 % produkce kyseliny citronové je využito v potravinářském a nápojovém průmyslu, asi 12 % ve farmaceutickém průmyslu a 18 % připadá na ostatní průmyslová odvětví [13]. Mimo potravinářský průmysl je tato kyselina využívána jako přídavek do leptacích roztoků např. v jaderné technice, do bělicích prostředků, desinfekčních přípravků, lepidel, mycích a pracích prostředků [5].

### 1.3.4 Význam pro člověka

V lidském organismu je kyselina citronová biochemicky velmi významná, protože zahajuje složitý cyklus chemických reakcí, kterými se odbourávají bílkoviny, tuky a sacharidy až na konečné produkty oxid uhličitý a vodu. Tento cyklus byl poprvé navržen

v roce 1937 Hanse Krebsem (1900 – 1981). Je označován jako cyklus kyseliny citronové neboli citrátový cyklus nebo též dle svého objevitele jako Krebsův cyklus [11], [16].

#### 1.4 Kyselina octová (ethanová kyselina)

Octová kyselina (acetic acid), jejíž sumární vzorec je  $C_2H_4O_2$ , je nejběžnější monokarboxylovou kyselinou vyskytující se v potravinách. Je častou složkou potravin, při jejichž výrobě se uplatňují kvasné procesy [4]. Ocet je 8 – 10% vodný roztok kyseliny octové, který se barví kulérem, aby u malých dětí nedošlo k záměně s jinými bezbarvými kapalinami [2].

Kyselina octová je štiplavě páchnoucí bezbarvá kapalina, odolná vůči oxidačním činidlům, a proto je často využívána jako rozpouštědlo při oxidačních reakcích. V potravinářství se uplatňuje díky svým konzervačním účinkům [3]. Pro čistou kyselinu octovou se používá přívlastek ledová, protože při teplotě 17 °C se vyskytuje ve formě drobných krystalů připomínajících krystalky ledu (obr. 2) [17].



Obr. 2 – Ledová kyselina octová [1]

##### 1.4.1 Výskyt

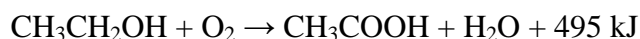
Kyselina octová je jedním z přirozených metabolitů v živých organizmech. Aktivní formou je její komplex s koenzymem A, označovaný acetyl-CoA (acetylkoenzym A), který

je jedním z nejdůležitějších meziproductů buněčného metabolismu sacharidů a tuků. Vyskytuje se běžně v rostlinách jako volná kyselina, nebo ve formě solí (octanů). Ve větším množství je obsažen v kvasícím ovoci [1].

### 1.4.2 Výroba

Kyselina octová se vyrábí mikrobiální cestou nebo chemickou syntézou. Kyselina octová patří mezi organické kyseliny, které jsou produkovány bakteriemi, na rozdíl od kyseliny citronové, která je produkována plísněmi [5]. Ocet je v historii lidstva stejně starý jako víno, pivo či alkoholické nápoje, ze kterých se vyráběl samovolným kvašením. Pro potravinářské účely se kyselina octová vyrábí z etanolu, ovocných vín nebo moštů jako kvasný lihový nebo ovocný ocet [4]. Způsob výroby octa je v různých zemích závislý na dostupnosti suroviny, ze které je vyráběn. V Americe a Švýcarsku se vyrábí ocet ovocný, v Anglii převažuje ocet obilný a ve státech s vyšší produkcí vína převažuje výroba vinného octa [18].

Producenty kyseliny octové jsou aerobní bakterie rodu *Acetobacter* a *Gluconobacter*, které mají schopnost produkovat řadu organických sloučenin [19]. *Acetobacter aceti* subsp. *aceti* je používán pro průmyslovou výrobu octu a *Acetobacter aceti* subsp. *orleansis* je používán při výrobě vinného octa orleánskou metodou (kvašením méněhodnotného vína). Tato metoda je ovšem zdlouhavá a finančně nákladná. Kyselina octová vzniká oxidací etanolu octovými bakteriemi dle rovnice:



Během reakce se do prostředí uvolňuje značné množství tepla, a proto ji označujeme jako silně exotermickou [5].

### 1.4.3 Využití

Kyselina octová má rozsáhlé použití. Využívá se ve formě octa jako pochutina k přípravě pokrmů a díky svým antimikrobiálním účinkům se používá jako konzervační prostředek při výrobě zeleninových a rybích konzerv [15]. Mimo potravinářský průmysl nachází ocet uplatnění jako výchozí surovina pro výrobu léků, barviv, umělých vláken a laků [20].

#### 1.4.4 Vliv na člověka

Kyselina octová je v přiměřených dávkách a dostatečném ředění vodou pro člověka zcela neškodná. Vysoce koncentrovaná je však značně agresivní a může způsobit při kontaktu s kůží rozsáhlé popáleniny. Příznaky popálenin kyselinou octovou se mohou projevit až po několika hodinách, kdy už je tkáň zasažena do značné hloubky. Při zasažení sliznic (např. vdechováním par) může dojít k jejich silnému poleptání, což se může projevit dýchacími potížemi. Při zasažení očí dochází k silnému poleptání rohovky, které může vést až k oslepnutí. Požití koncentrované kyseliny octové způsobuje poleptání sliznic v ústech, jícnu a žaludku. Požití se projevuje silnou bolestivostí zasažených sliznic, vrhnutím a střevními problémy a ve velkých dávkách může vést až k úmrtí.

## 2 CHROMATOGRAFIE

Chromatografické dělení převládá mezi moderními separačními metodami. Směs látek, která má být separována je rozpuštěná v mobilní (pohyblivé) fázi, kterou bývá kapalina nebo plyn. Takto připravený roztok proniká sloupcem pórovitého pevného materiálu, který bývá označován jako stacionární (nepohyblivá) fáze. Při průchodu sloupce reagují jednotlivé složky rozpuštěné v mobilní fázi s pevnou fází na základě svých vlastností. Jestliže na počátku sloupce tvoří směs jeden proužek, působením různých sil během průchodu se mění rychlost postupu jednotlivých látek a výsledkem může být rozdělení směsi na několik proužků, které odpovídají čistým, separovaným látkám [22].

Podstata chromatografie spočívá v neustálém procesu dělení. Jeden krok může mít jen malou účinnost, ale protože se stále opakuje, dojde k oddělení jednotlivých složek [21]. Při dělení tedy dochází k opakovanému pohybu molekul složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní [22]. Složky separovaného vzorku mohou být během pohybu v mobilní fázi zachytávány fází stacionární, a proto se při pohybu zadržují. Více se zadrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají složky méně zadržované [23].

Kolonová kapalinová chromatografie je nejstarší ze všech chromatografických metod. Objevení chromatografie sahá do devadesátých let 19. století a je spojováno se jménem ruského botanika Michaila Semenoviče Cveta, který použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů [24]. Název metody vznikl spojením dvou řeckých slov chroma (barva) a grafem (psát). Metoda chromatografie byla znovu použita až v roce 1941 [25]. Chromatografických metod je velké množství. Je možné je rozdělit dle několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme:
  - kapalinovou chromatografii (Liquid Chromatography - LC) – mobilní fáze je kapalina,
  - plynovou chromatografii (Gas Chromatography - GC) – mobilní fáze je plyn.
- Podle uspořádání stacionární fáze rozdělujeme chromatografické metody na:
  - kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v koloně (trubicí),

- 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 [23].
- Obvykle se při separaci uplatňuje víc fyzikálně-chemických dějů, ale jeden z nich je vždy převládající, což je další možné kritérium pro dělení na:
  - rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).
  - adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje určitá schopnost složek poutat se (adsorbovat) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
  - iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.
  - gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zadržují déle.
  - afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu).

## 2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. Kapalinová chromatografie je obecný název, který se používá k popisu jakékoli chromatografické procedury, při které se používá kapalná mobilní fáze [26]. HPLC zahrnuje soubor metod, které jsou založené na různém mechanismu separace, jejichž společnou vlastností je použití kapalně mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu [22]. Vysoké účinnosti je dosaženo použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti homogenně vyplňující kolonu [25]. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem, což je také důvod, proč bývá tato metoda označována jako vysokotlaková kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography). Při nástřiku vzorku se dávkuje jen velmi malá množství, řádově mikrolitry [27]. Vedle

technického pokroku umožnily rozvoj HPLC i poznatky z teorie plynové chromatografie, které objasnily podstatu pochodů v koloně a jejich souvislost s účinností chromatografického procesu [22].

Mezi výhody HPLC patří hlavně široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Metodou HPLC je možné analyzovat přibližně 80 % veškerých známých látek. Metoda vhodně doplňuje také plynovou chromatografii. Mezi další výhody se řadí možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, automatické vyhodnocení dat a rychlost analýzy, protože čas potřebný pro dosažení úplného rozdělení je kratší než 1 hodina. Nevýhodou ve srovnání s plynovou chromatografií je náročnější práce s přístroji a složitější mechanismus separace či vysoká pořizovací cena a malá kapacita, což umožňuje stanovovat pouze malé množství látky [21], [27].

Tabulka 2 - Srovnání použitelnosti HPLC a ostatních metod [27]

Metoda	Rozsah $M_r$ – molekulární hmotnost analytů	Analyzované látky
HPLC	3 - $10^6$	nízkomolekulární látky, polymery, ionty, polární a nepolární látky
GC	1 – 400	plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, látky netěkavé, látky po derivatizaci, makromolekulární látky
PC, TLC	100 - 2000	látky polární, nepolární, ionty

Metody HPLC lze obecně použít pro:

- separaci a rozpoznání látek ve směsích,
- kvantitativní analýzu látek ve směsích,
- kontrolu čistoty preparátů,
- kontrolu surovin, výrobních meziproductů a productů,
- kontrolu životního prostředí (pesticidy v ekosystémech, potravinách, krmivech),
- klinickou a toxikologickou analýzu (hormony, léčiva v tělních tekutinách),
- kontrolu potravinářských productů,

- biologické a biochemické aplikace (analýza bílkovin a nukleových kyselin),
- zemědělské využití (sledování migrace herbicidů v půdě) [21].

### 2.1.1 Základní pojmy

K objasnění principu chromatografické separace je třeba definovat některé pojmy.

Retenční čas  $t_R$  představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce. Je odečítán z chromatografu jako vzdálenost mezi okamžikem nástřiku a maximem příslušného chromatografického píku. Hodnoty retenčního času jsou udávány většinou v minutách, nebo vteřinách.

Retenční objem  $V_R$  je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

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

Mrtvý objem kolony  $V_M$  je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od začátku ke konci kolony [25].

### 2.1.2 Mobilní fáze

Fáze pohyblivá (plyn, kapalina) je bez ohledu na skupenství označována jako fáze mobilní. Na rozdíl od plynové chromatografie není mobilní fáze v HPLC netečná, ale výrazně se podílí na separačním procesu. Možnosti změny mobilní fáze jsou neomezené a je vždy snazší použít jinou mobilní fázi než měnit stacionární fázi. Vlastnosti mobilní fáze jsou důležité z hlediska separace i detekce. Mobilní fáze by měla dávat v detektoru minimální odezvu, aby tak umožnila co nejcitlivější detekci solutů [27].

### 2.1.3 Stacionární fáze

Fáze nepohyblivá – stacionární, může mít v chromatografii velmi rozdílnou formu. Mohou to být částičky tuhé fáze o velikosti jednotek až stovek mikrometrů, nebo tenká vrstva kapaliny nanosená na tuhých částicích nebo také film kapaliny na vnitřní straně kapiláry. Pro jakoukoli formu stacionární fáze se zavedl pojem sorbent. Sorbentem je naplněna kolona, přes kterou prostupuje mobilní fáze [22].



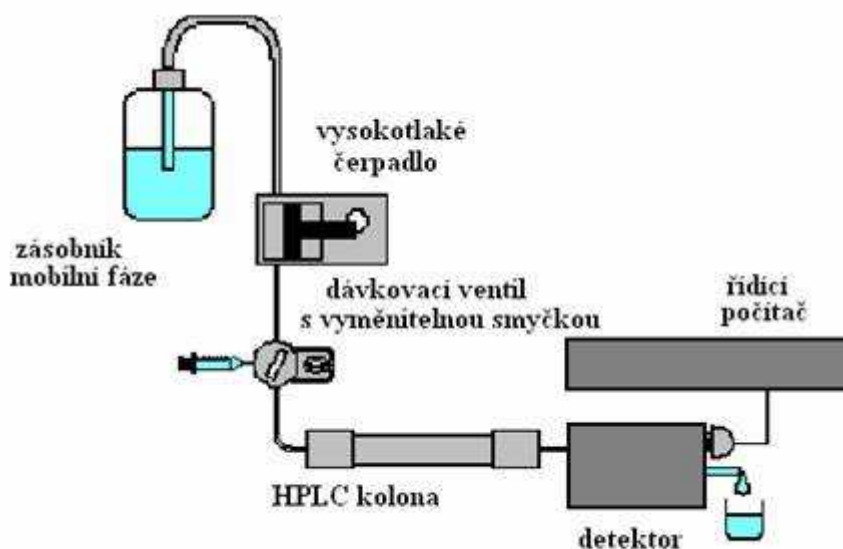
Velký vliv na separaci při použití náplňových kolon má velikost a uspořádání částic. Běžně se používají částice o velikosti 5 až 10  $\mu\text{m}$ , ale jsou dostupné i náplně s velikostí částic 2  $\mu\text{m}$  a menší. Dále platí, že separace je účinnější, pokud mají částice pravidelný tvar, stejnou velikost a kolona je jimi rovnoměrně vyplněna. Tyto stacionární fáze mají i nevýhody, mezi které se řadí nedokonalé rozložení částic v koloně. V průběhu používání se působením vysokého tlaku částice sesedají a znehodnocují kolonu.

Dalším typem jsou monolitické stacionární fáze. Kolona je vyplněna polymerem o známé pórovitosti buď organického, nebo anorganického původu. Monolitické kolony se vyznačují velkou mechanickou stabilitou, odolností vůči změnám pH a velkou účinností separace i při velkých průtocích mobilní fáze.

Novým typem stacionární fáze jsou vtištěné polymery, které jsou podobné monolitickým kolonám. Vtištěné polymery jsou vhodné především pro obtížné separace, jako jsou například chirální separace léčiv [27].

#### 2.1.4 Uspořádání kapalinového chromatografu

Moderní kapalinový chromatogram se skládá z několika částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, jejich detekci, záznam a zpracování dat (obr. 3). Mimo těchto hlavních částí je možné použít doplňková zařízení, kterými jsou ochranné filmy a předkolony, přístroje pro odplynění mobilní fáze, ventily pro připojování několika chromatografických kolon v průběhu separace, nebo lze také použít několik detektorů zařazených za sebou [22].



Obr. 3 – Schéma kapalinového chromatografu [34]

### Čerpadla

Kapalina je do kolony čerpána pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobrá čerpadla docilují průtoku od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu. V praxi jsou využívána dvojčinná čerpadla, čerpadla zapojená do série nebo čerpadla využívající dvou či více pístů, protože jednočinná pístová čerpadla způsobují rušivé tlakové nárazy. Čerpadla s kmitavým pohybem pístu jsou nahrazována čerpadly založenými na principu injekční stříkačky, které jsou naplněné zásobou mobilní fáze. Výhodou jsou menší finanční náklady, ale nevýhodou je omezený objem mobilní fáze vyžadující časté naplňování [23].

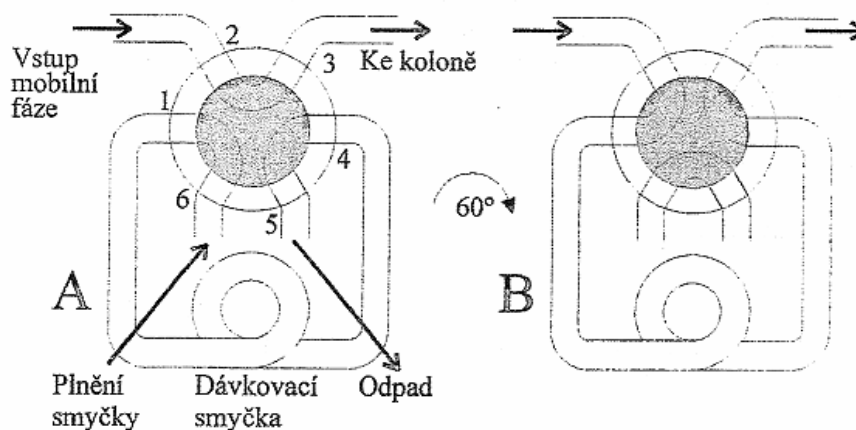
V HPLC jsou využívány dva základní typy čerpadel. Prvním typem je lineární čerpadlo, které je složeno z pístu, pohybujícím se v pracovním válci o objemu až několik set mililitrů. Mobilní fáze je před analýzou naplněna do válce a posuvem pístu je následně vytlačována do dávkovacího ventilu a separační kolony. V druhém případě je píst ve válci o objemu desítek až stovek mikrolitrů, který periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi ze zásobníku do dávkovacího ventilu a na kolonu. Pak hovoříme o jednopístovém recipročním čerpadle [25]. Pro čerpadla použitá v HPLC jsou poměrně náročné požadavky:

- čerpadla musí být konstruována z materiálů, které jsou odolné vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází (slabě kyselé a zásadité roztoky, organická rozpouštědla), k čemuž jsou vhodné nerezová ocel, titan, nebo keramické materiály,

- čerpadla mají být schopna dávkovat mobilní fázi bez kolísání průtoku,
- vnitřní objem čerpadla má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze [22].

### Dávkovací zařízení

Při dávkování vzorku je důležité, aby nedošlo ke kolísání průtokové rychlosti mobilní fáze. Požadovaný objem vzorku musí být vstříknutý do proudu mobilní fáze pod velkým tlakem. Vzorky určené k separaci v kapalinovém chromatogramu musí být dobře rozpuštěné, nejlépe v rozpouštědle o stejném složení jako má mobilní fáze. Pokud jsou ve vzorku přítomny tuhé částice, je nutné je odfiltrovat. Při použití injekční stříkačky k dávkování vzorku může dojít k vnášení stop materiálu injekční stříkačky, nebo je tento způsob spojen s možností neudržení nastaveného tlaku. Injekční zařízení použité k nástřiku vzorku je možné ovládat ručně nebo automaticky a mělo by být vyrobené z netečného materiálu jako je nerezová ocel či titan [23]. Nejčastěji používané dávkovací zařízení je šesticestný ventil s dávkovací smyčkou známého objemu. Dávkovací ventil má šest vstupů, přičemž jsou vždy dva propojeny kanálkem. Po pootočení jádra ventilu se změjí vnitřní propojení jednotlivých dvojic vstupů (obr. 4).



Obr. 4 – Dávkovací ventil [25]

Pokud dochází k plnění dávkovací smyčky vzorkem, proudí mobilní fáze do kolony a přes vstup číslo 6 je možné ji naplnit analyzovaným vzorkem, jehož přebytek odteče vstupem číslo 5 (část A). Při otočení ventilu o 60 stupňů je obsah smyčky vtlačen proudem mobilní fáze do separační kolony a po celou dobu analýzy zůstává ventil v této poloze [25].

## Kolony

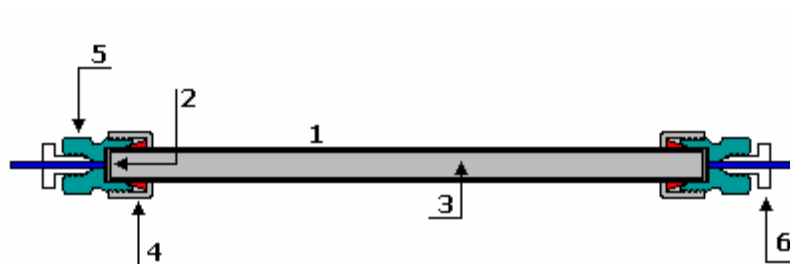
Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii má velký význam volba vhodné kolony, protože výsledek chromatografické analýzy je určován kvalitou kolony a její náplně (obr. 5).



Obr. 5 – Chromatografická kolona Ascentis C18

Účinnost kolon závisí nejen na kvalitě použitého sorbentu, ale i na tvaru, délce a vnitřním povrchu kolony [28]. Plášť kolony musí splňovat následující podmínky:

- musí být chemicky neaktivní, nejpoužívanější materiál pro výrobu chromatografických kolon je nerezová ocel, sklo, nebo plast,
- musí odolávat vysokým pracovním tlakům,
- vnitřní povrch pláště kolony musí být hladký [29].



Obr. 6 – Schéma chromatografické kolony [35]

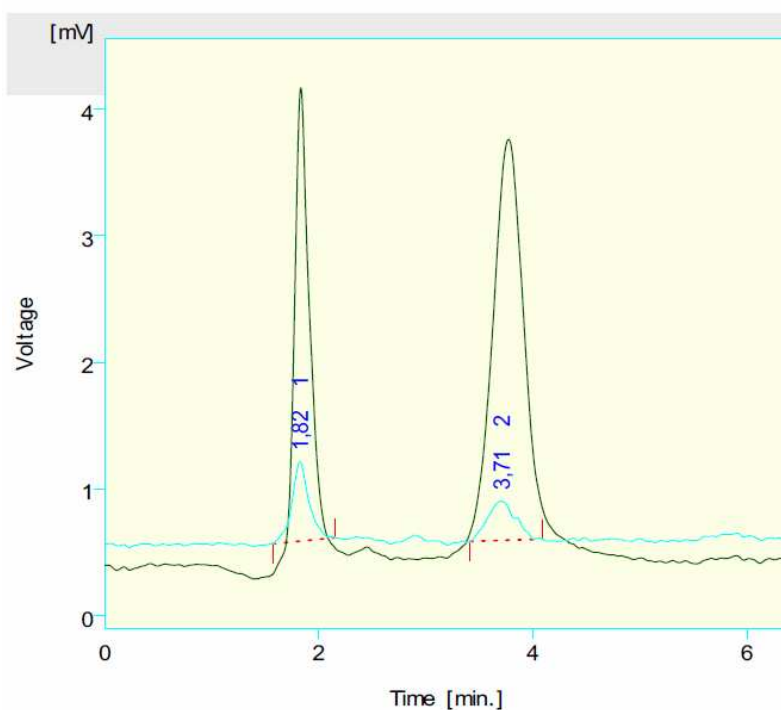
HPLC kolona je tvořena z šesti hlavních částí (obr. 6): 1. kovový plášť, 2. kovová frit, uzavírající plášť, 3. stacionární fáze, 4. ochranný kroužek zakončující oba konce kolon, 5. koncovou hlavici, 6. vstup kapiláry se šroubem [30].

Nejčastěji používané HPLC kolony jsou dlouhé 30 – 300 mm a jejich vnitřní průměr je 2 – 5 mm. Čím je kolona delší, tím se zvyšuje účinnost separace, ale roste také doba potřebná k provedení analýzy a je nutné použít vyšší tlak. Stacionární fází bývá obvykle oxid křemičitý s vhodnou zrnitostí. Běžně jsou používány stacionární fáze, které nemají schopnost zadržovat vodu a rozpouštět se v ní s navázanými uhlovodíkovými funkčními skupinami. Stacionární fáze je pojmenována podle počtu atomů uhlíku v řetězci, např. C8 - oktyl, C18 – oktadecyl [25].

### Detektory

Důležitou součástí chromatografu je detektor, který detekuje složku vycházející z kolony. Detektory jsou řazeny na konci kolony a zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze se vzorkem.

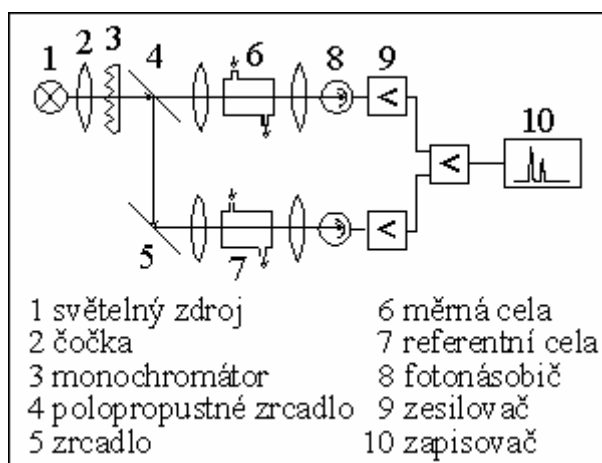
Signál z detektoru je zapisován pomocí zapisovače a výsledkem analýzy je záznam chromatografické separace tzv. chromatogram (obr. 7). Na ose y je vynesena odezva detektoru a na ose x je zaznamenán čas.



Obr. 7 - Chromatogram

### Fotometrický detektor UV-VIS

Tento typ detektoru je v HPLC nejrozšířenější a využívá se k 70 % až 80 % separací. Detekované látky musejí být schopny absorbovat záření vlnové délky, které bylo použito při detekci. Přes stěnu kyvety prochází světelný paprsek ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu (obr. 8).



Obr. 8 – Schéma fotometrického detektoru [36]

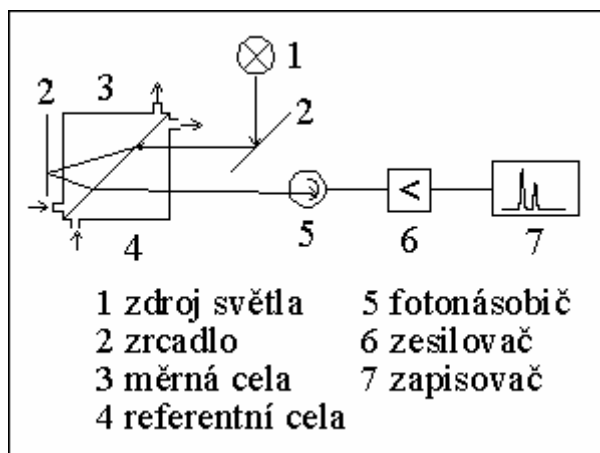
Výběr světelného zdroje je závislý na sledovaném oboru vlnových délek. Pro ultrafialovou oblast (200 nm – 350 nm) se používá deuteriová výbojka a pro oblast viditelného záření (350 nm – 700 nm) je používána halogenová žárovka [25]. Podle toho, při jaké vlnové délce je provedeno měření se rozlišují čtyři konstrukční typy detektorů:

- detektory, které pracují s jednou, trvale nastavenou vlnovou délkou,
- detektory, u nichž lze volit mezi několika předem danými vlnovými délkami,
- detektory, které jsou opatřeny monochromátorem, u nichž lze vlnovou délku nastavit,
- detektory pracující s velkým počtem fotodiód, u kterých je možný rychlý záznam spektra aniž by došlo k přerušení chromatografické separace na koloně.

Pro organické látky je využití fotometrického detektoru pracujícího v ultrafialové oblasti prakticky univerzální.

### Refraktometrický detektor - RI detektor

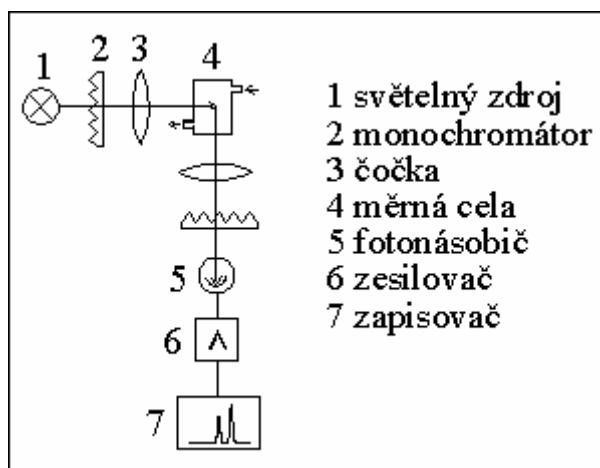
Refraktometrický detektor měří rozdíl mezi indexem lomu vzorku a čisté mobilní fáze (obr. 9). Citlivost detektoru roste s rozdílem indexu lomu stanovené látky a indexem lomu čisté mobilní fáze. Tento typ detektoru je univerzální, ale není velmi citlivý. Při jeho použití je třeba udržovat konstantní teplotu cel detektoru [31].



Obr. 9 – Schéma refraktometrického detektoru [36]

### Fluorimetrický detektor - FLD

Fluorimetrický detektor je založen na principu fluorescence, tedy schopnosti látek pohlcovat ultrafialové záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce, které je měřené fotonásobičem (obr. 10). Jako zdroj záření se nejčastěji využívá miniaturní vysokotlaká xenonová výbojka nebo laser. Tento detektor je vhodný v kombinaci s fotometrickým detektorem [23], [25].



Obr. 10 – Schéma fluorimetrického detektoru [36]

### Elektrochemický detektor - ECD

Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud, kapacitu) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru, v němž jsou umístěny elektrody s pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce[30]. Další zaznamenávaná veličina je čas. V podstatě jde o elektrochemický článek, u kterého se sleduje jeho chování při měnícím se složení roztoku. Tento typ detektorů lze využít tam, kde jsou v roztocích obsažené oxidovatelné nebo redukovatelné složky na polarizovatelné elektrodě. Podle podmínek měření můžeme rozdělit elektrochemické detektory na:

- amperometrické (polarografické) detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru,
- coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukcí celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru a dosahuje se tak vyšší citlivosti detekce než u amperometrických detektorů [32]. Příkladem je ESA Coulochem III (obr. 11).



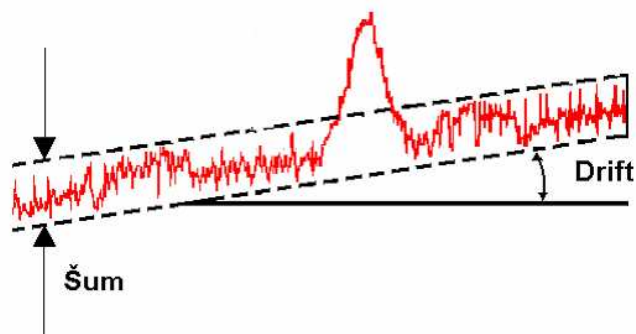


Obr. 11 – Coulochem III [37]

Výhodou těchto detektorů je jejich vysoká citlivost detekce a poměrně nízké pořizovací náklady [22]. Nevýhodou ECD jsou vysoké požadavky na mobilní fázi. K tomu aby byla dosažena stabilní nulová linie, musí být mobilní fáze čistá a dokonale odplyněná. Přítomnost kyslíku v mobilní fázi by mohla způsobit šum a drift základní linie [32].

Šum je krátkodobá výchylka v základní linii způsobená změnou elektrického signálu, teploty nebo jinými faktory. Šumem se tedy rozumí kolísání odezvy detektoru pocházejících z periodických změn v systému.

Drift se vztahuje ke kolísání signálu detektoru. Drift ukazuje dlouhodobou nestabilitu základní linie a vyjadřuje se jako průměrný sklon obálky šumu (obr. 12). Obvykle je spojen se změnou teploty detektoru při jeho první půlhodině provozu [32].



Obr. 12 – Grafické znázornění šumu a driftu [32]

### **Hmotnostní spektrometr**

Využívá možnosti přímé identifikace jednotlivých separovaných látek, které vychází z kolony na základě získaných hmotnostních spekter [25].

### **Detektor s diodovým polem - DAD**

Detekce je založena na principu snímání a měření intenzity záření různých vlnových délek spektra po průchodu záření vzorkem a jeho rozložení holografickou mřížkou [25].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 METODIKA PRÁCE

#### 3.1 Příprava mobilních fází a vzorků pro analýzu

##### 3.1.1 Příprava mobilní fáze 1

Pro přípravu mobilní fáze byla použita kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) a redestilovaná voda ( $\text{rH}_2\text{O}$ ) v poměru 30 : 1 : 69. Na přípravu 1 litru mobilní fáze bylo v odměrném válci odměřeno 300 ml  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 10 ml metanolu a 690 ml redestilované vody. Bylo upraveno pH na hodnotu pH 3 pomocí roztoku hydroxidu draselného (KOH). Takto upravený roztok byl přefiltrován na filtrační aparatuře s použitím filtrů SUPELCO – Nylon 66 Membranes 0,2  $\mu\text{m}$  x 47 mm.

##### 3.1.2 Příprava mobilní fáze 2

Pro přípravu mobilní fáze byly použity stejné chemikálie jako v 3.1.1, ale byly smíchány v jiném poměru a kyselina fosforečná měla koncentraci 85 %. Na 1 litr bylo v odměrném válci odměřeno 990 ml metanolu, 5 ml redestilované vody a 5 ml kyseliny fosforečné. Podle potřebného množství byla během analýzy připravována mobilní fáze tak, aby vždy byl zachován poměr metanol : kyselina fosforečná : redestilovaná voda, 99 : 0,5 : 0,5.

##### 3.1.3 Příprava mobilní fáze 3

Byla připravena mobilní fáze MDTM, která se používá pro analýzu biogenních aminů. Při přípravě mobilní fáze došlo k modifikaci postupu vzhledem k dostupným chemikáliím. Bylo naváženo 10,35 g dihydrogenfosforečnanu sodného a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Tento roztok byl zfiltrován. Dále bylo naváženo 0,3675 g kyseliny sulfanylové a bylo přidáno 100 ml acetonitrilu, 100  $\mu\text{l}$  trimethylaminu a 250  $\mu\text{l}$   $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  EDTA. Bylo přidáno 900 ml redestilované vody a pH celé mobilní fáze bylo upraveno pomocí kyseliny fosforečné na výslednou hodnotu pH 3.

### 3.1.4 Příprava měřených vzorků

Pro zkoušení metodiky pro stanovení kyseliny citronové a octové byly použity standardy kyselin rozpuštěných v mobilní fázi a jako druhý typ byl použit standard kyselin rozpuštěných v redestilované vodě.

Na analytických vahách bylo naváženo 0,001 g bezvodé kyseliny citronové p.a. a rozpuštěno v 10 ml mobilní fáze. Stejně množství bylo rozpuštěno v 10 ml redestilované vody. Dále bylo naváženo 0,005 g a 0,01 g bezvodé kyseliny citronové p.a. a bylo rozpuštěno ve stejném objemu mobilní fáze i redestilované vody. Takto připravené vzorky byly přefiltrovány.

Do 10 ml mobilní fáze bylo přidáno 9,5  $\mu\text{l}$  koncentrované kyseliny octové p.a. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml do 10 ml odměrné baňky a doplněn mobilní fází po rysku, aby byl získán vzorek  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Stejný postup byl zopakován i při přípravě  $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  kyseliny octové v mobilní fázi, ale místo 9,5  $\mu\text{l}$  koncentrované kyseliny octové bylo odměřeno 47,6  $\mu\text{l}$  koncentrované kyseliny octové. Druhý vzorek byl připraven stejným postupem, ale místo mobilní fáze byla použita redestilovaná voda. Takto připravený vzorek byl přefiltrován.

## 3.2 Přístrojové vybavení

Pro přípravu vzorků bylo použito běžné laboratorní sklo a navážky byly provedeny na analytických vahách ADAM, AFA – 210 LC. pH mobilní fáze bylo vždy upravováno na pH metru Microprocessor pH Meter společnosti HANNA instruments. Analyzované vzorky byly nastříknuty stříkačkou HAMILTON o objemu 50  $\mu\text{l}$ . Pro analýzu byly použity kolony Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) a Ascentis C 18 (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ).

## 3.3 Použité chemikálie

Kyselina fosforečná, která byla použita pro přípravu mobilních fází a bezvodá kyselina citronová p.a., která byla použita pro přípravu analyzovaného vzorku, byly dodány od Ing. Petra Lukeše (Uherský Brod, ČR). Etanol pro HPLC byl pořízen od společnosti POCH SA (Gliwice, Polsko). Pro úpravu pH byl použit hydroxid draselný, který je dodáván od firmy PENTA (Chrudim, ČR). Od stejného dodavatele byla pořízena i kyselina octová p.a., ze které byl připraven druhý analyzovaný vzorek.

### 3.4 Experimentální podmínky

Všechna měření byla provedena při nastavení termostatu kolony na teplotu 30° C. Vzorek byl dávkován ručně pomocí stříkačky. Průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu 0,9 ml · min<sup>-1</sup> a čas analýzy byl nastaven na 20 minut. Na základě prvotních měření byl tento čas zkrácen na 15 minut a dále až na 12 minut. Napětí, při kterém bylo měření prováděno je uvedeno v tabulce. Každý vzorek byl za stejných podmínek stanovován třikrát a ochranná cela byla vždy nastavena o 100 až 150 mV větší než nastavení parametrů detektoru.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Možnosti detekce kyseliny citronové a octové na koloně ASCENTIS C18 pomocí ECD

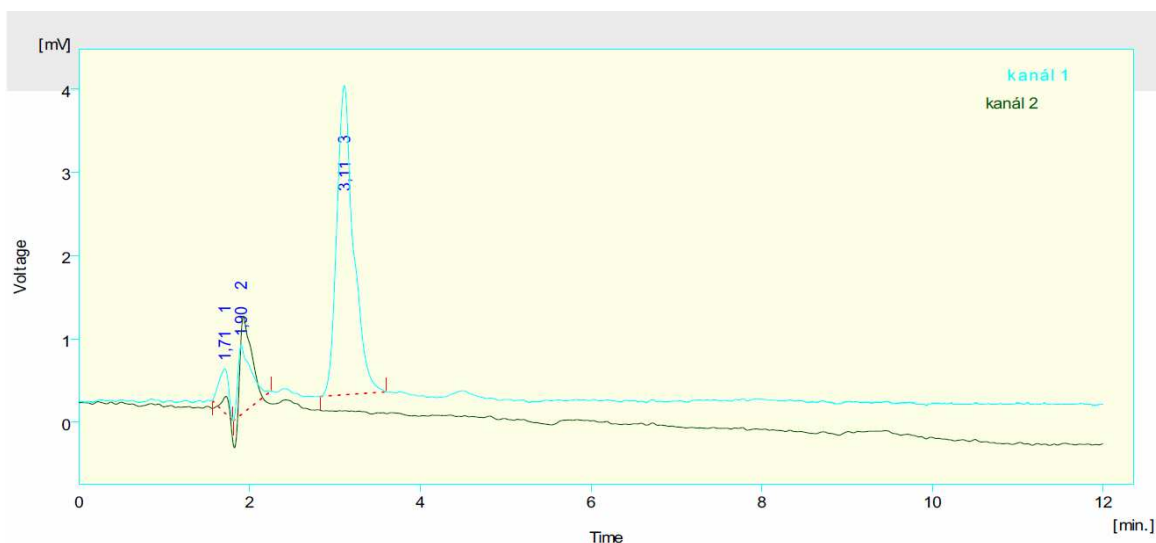
#### 4.1.1 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 1

Tabulka 3 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 1

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v mobilní fázi; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	700, 800	+
		600, 700	+
		500, 600	+
		400, 500	-
		300, 400	-
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v redestilované vodě; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	700, 800	+
		600, 700	-
		500, 600	-
		400, 500	-
		300, 400	-
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v mobilní fázi; 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	600, 700	+
		500, 600	-
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v redestilované vodě; 500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	600, 700	+
		500, 600	-

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v mobilní fázi; 1 mg · ml <sup>-1</sup>	500, 600	+
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v redestilované vodě; 1 mg · ml <sup>-1</sup>	500, 600	-

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že pozitivní výsledek (obr. 13) byl zaznamenán při měření kyseliny citronové (100 µg · ml<sup>-1</sup>) rozpuštěné v mobilní fázi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH, rH<sub>2</sub>O v poměru 30 : 1 : 69 při parametrech detektoru E1 500 mV a E2 600 mV.

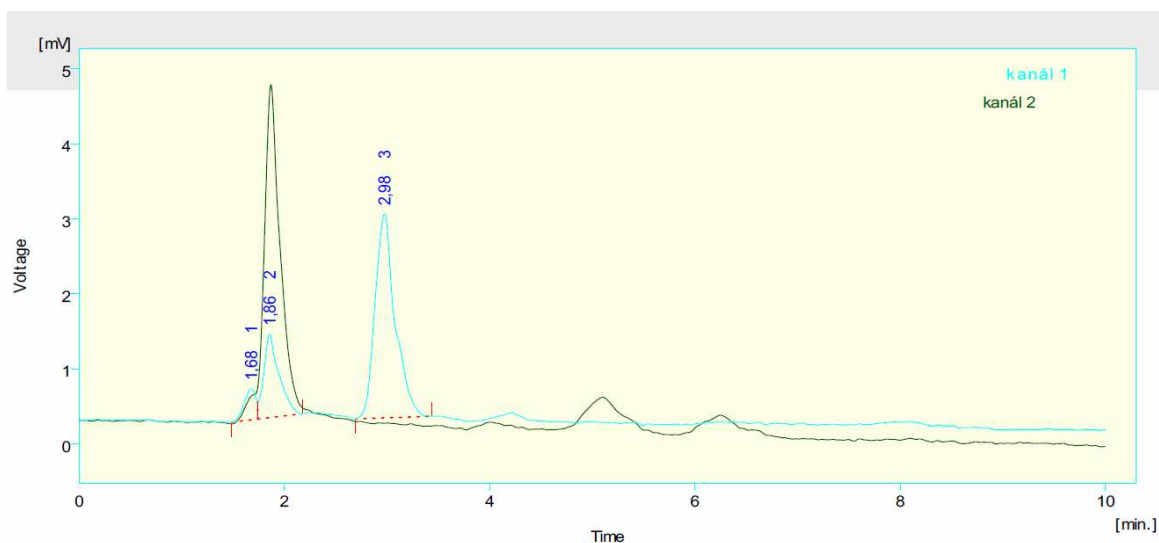


Obr. 13 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové (100 µg · ml<sup>-1</sup>), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV

Pro vyloučení odezvy mobilní fáze, byla za stejných podmínek změřena odezva mobilní fáze a redestilované vody. Na základě daného měření byla v retenčním čase 3,11 min určena odezva kyseliny citronové.

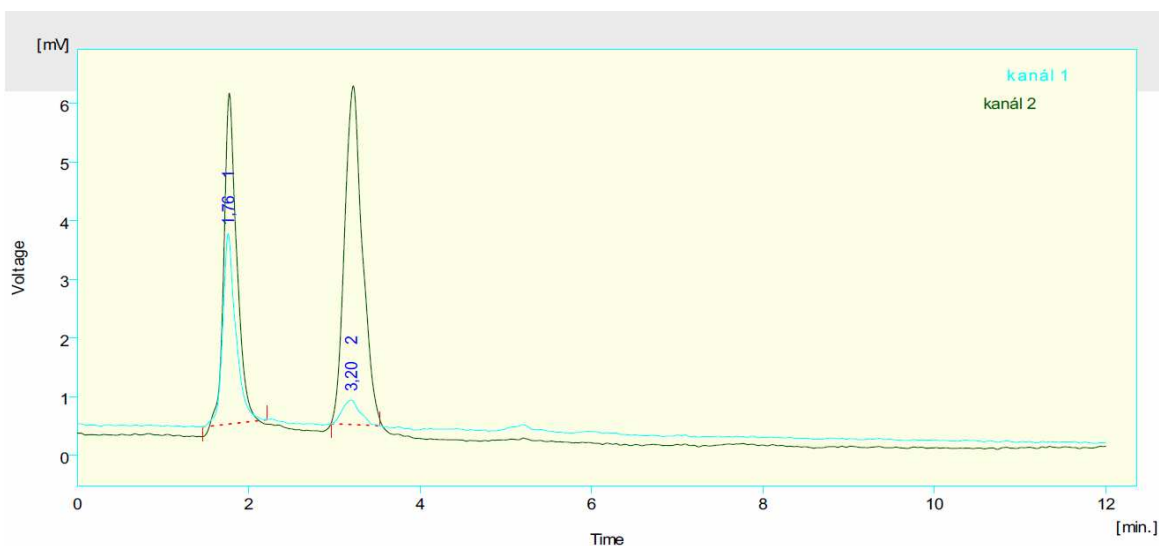


Pro další měření byly změněny pouze parametry detektoru na  $E1 = 600 \text{ mV}$  a  $E2 = 700 \text{ mV}$ . V retenčním čase 2,98 min byl zaznamenán pík kyseliny citronové (obr. 14).



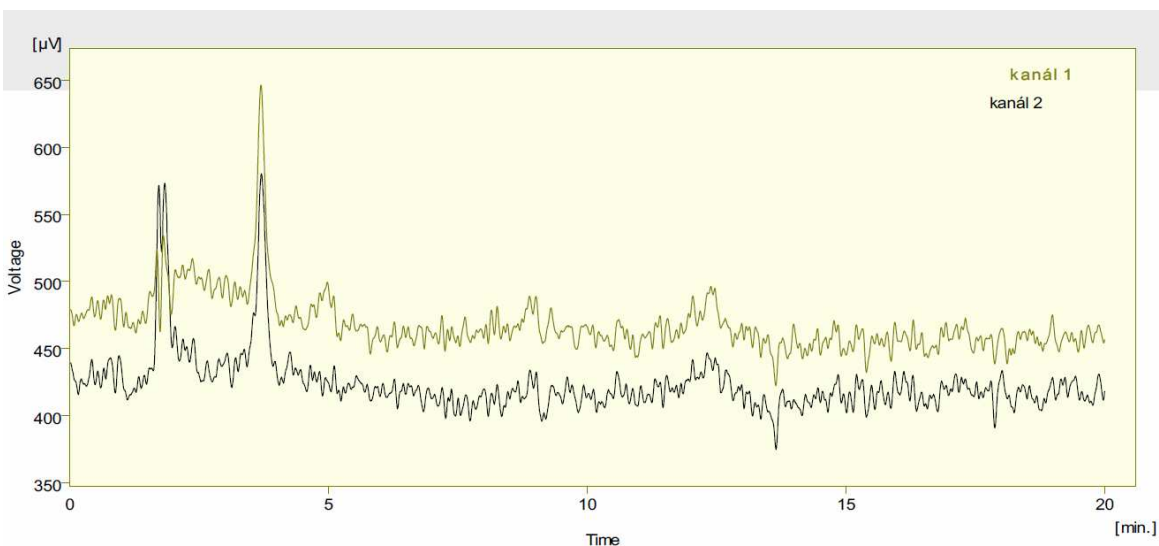
Obr. 14 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 600 \text{ mV}$ ,  $E2 = 700 \text{ mV}$

Při měření stejného vzorku byly zvýšeny parametry detektoru na  $E1 = 700 \text{ mV}$  a  $E2 = 800 \text{ mV}$ . Odezva kyseliny citronové byla zaznamenána v retenčním čase 3,20 min (obr. 15).



Obr. 15 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$

Při nastavení nižších parametrů detektoru ( $E1 = 400 \text{ mV}$ ,  $E2 = 500 \text{ mV}$ ;  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ) byla odezva kyseliny citronové velmi slabá. Odezva detektoru se pohybovala v jednotkách  $\mu\text{V}$ . Nižší potenciály se proto jeví jako nevhodné (obr. 16).



Obr. 16 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$

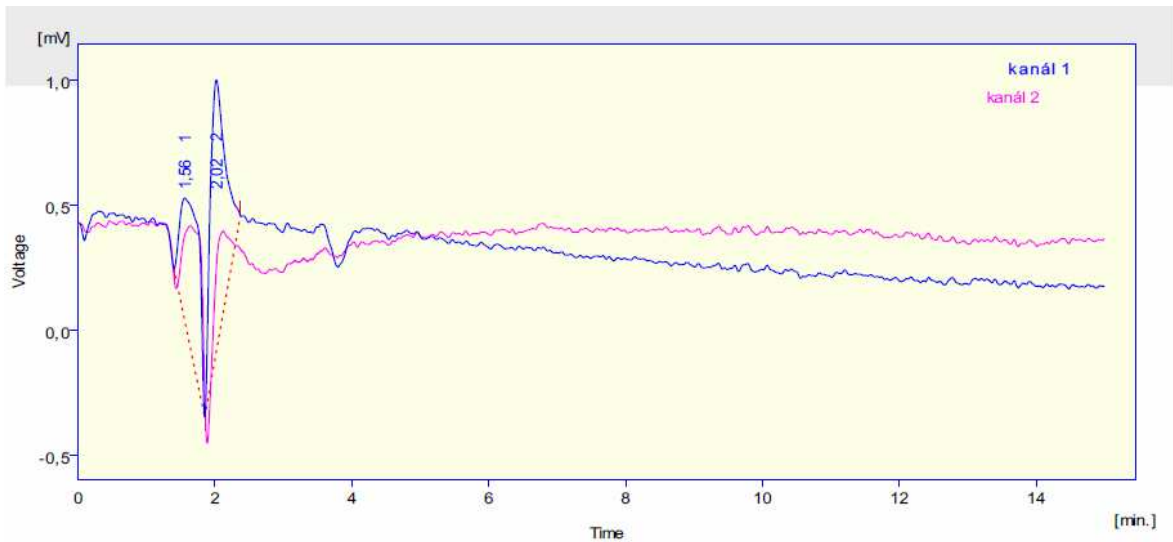
## 4.1.2 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 2

Tabulka 4 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 2

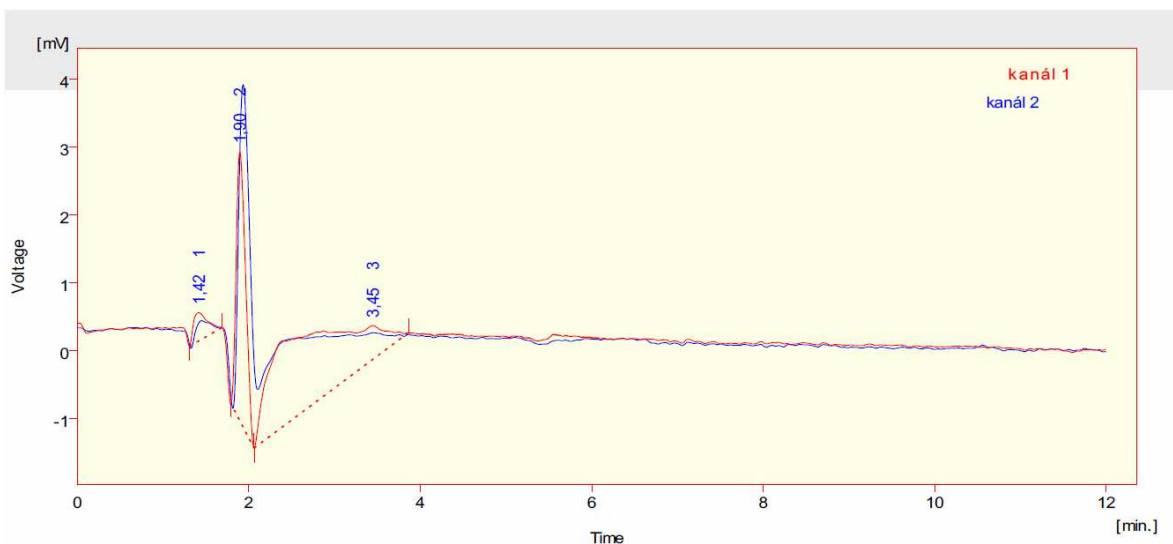
Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina citronová v mobilní fázi; 1 mg · ml <sup>-1</sup>	400, 500	-
		-100, -200	-
		-500, -600	-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina citronová v redestilované vodě; 1 mg · ml <sup>-1</sup>	400, 500	-
		-100, -200	-
		-500, -600	-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina citronová v mobilní fázi; 100 µg · ml <sup>-1</sup>	500, 600	-
		100, -100	-
		-100, -200	-
		-500, -600	-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina citronová v redestilované vodě; 100 µg · ml <sup>-1</sup>	-100, -200	-
		-500, -600	-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina citronová v mobilní fázi; 500 µg · ml <sup>-1</sup>	100, -100	-
		-500, -600	-

Tabulka 4 uvádí podmínky stanovení kyseliny citronové v mobilní fázi 2. Z charakteru odezvy je patrné, že nastavené parametry nebyly vhodné pro stanovení dané kyseliny (obr. 17, 18, 19). Obrázek 17 ukazuje měření kyseliny citronové (1 mg · ml<sup>-1</sup>) rozpuštěné v mobilní fázi při nastavení parametru detektoru E1 = -500 mV a E2 = -600 mV, na kterém je pouze odezva mobilní fáze. Na chromatogramu (obr. 18) se objevil pík, který by mohl být píkem kyseliny citronové, ale je velmi malý. Na (obr. 19) je chromatogram stanovení

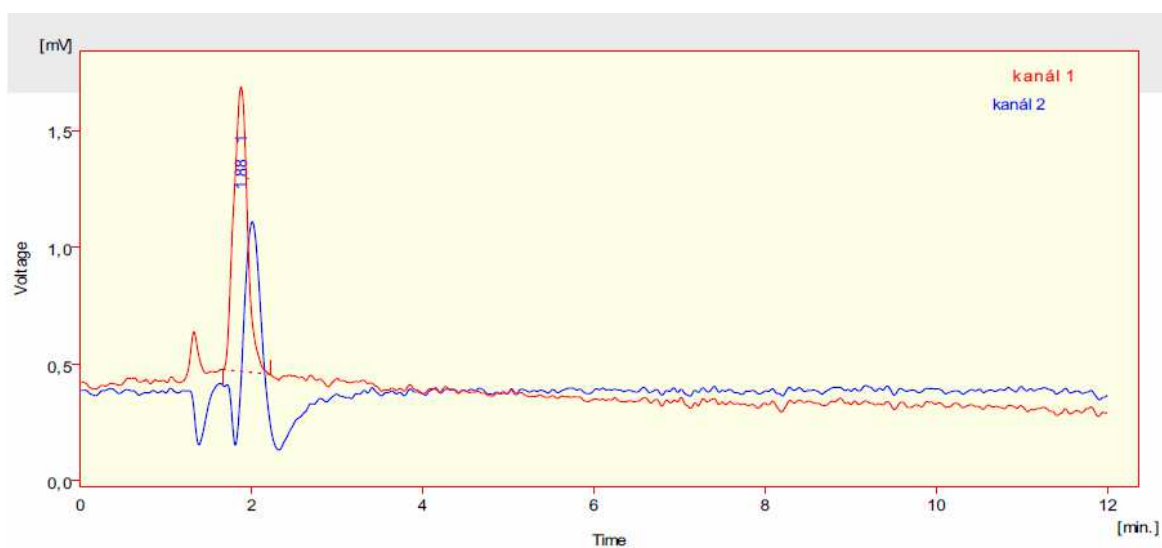
kyseliny citronové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) rozpuštěné v mobilní fázi při nastavení parametru detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$  a  $E2 = -100 \text{ mV}$ . V retenčním čase 1,88 min byla zaznamenána odezva mobilní fáze.



Obr. 17 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = -500 \text{ mV}$ ,  $E2 = -600 \text{ mV}$



Obr. 18 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$



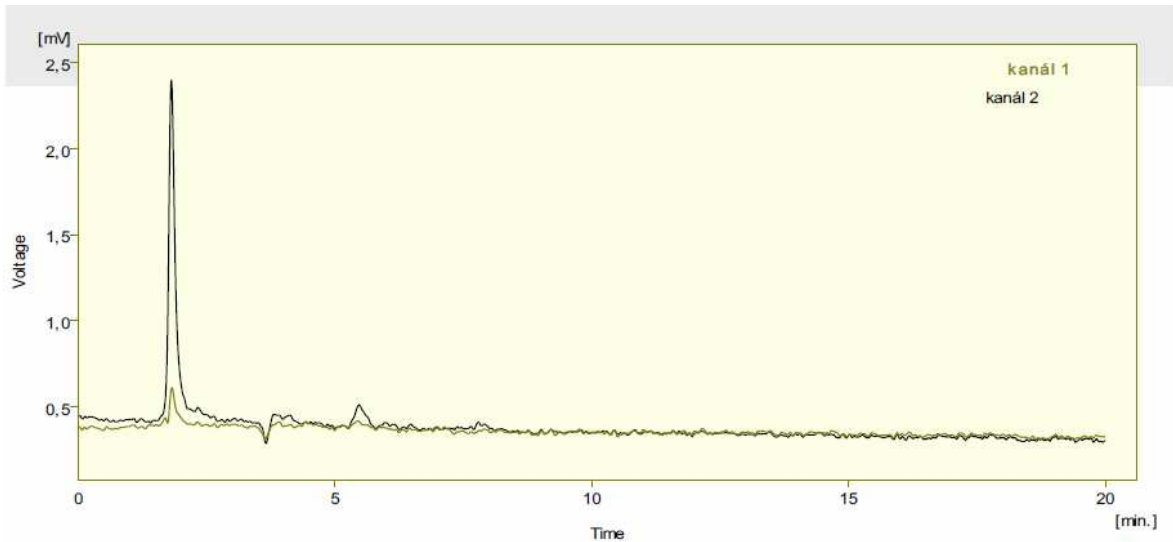
Obr. 19 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = -100 \text{ mV}$

#### 4.1.3 Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 1

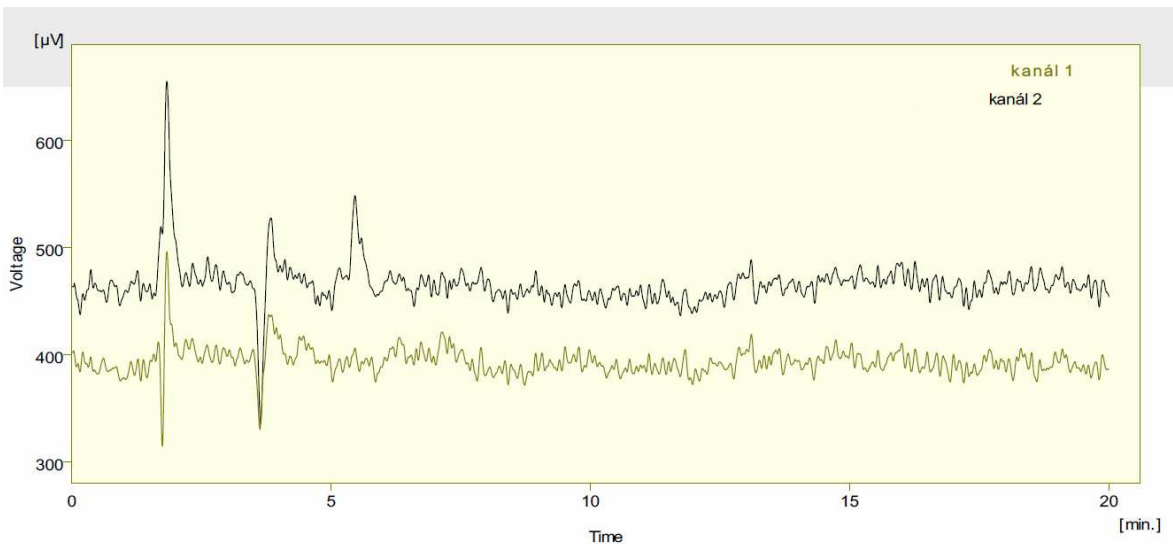
Tabulka 5 – Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 1

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru $E1, E2 \text{ [mV]}$	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina octová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	700, 800	-
		600, 700	-
		500, 600	-
		400, 500	-
		300, 400	-
		100, 200	-
		-100, 100	-
		-200, -100	-
-500, -600	-		

Tabulka 5 popisuje podmínky, za kterých byla stanovena kyselina octová. Vzorek kyseliny octové a mobilní fáze nevykazoval za těchto podmínek žádnou odezvu (obr. 20, 21).



Obr. 20 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$

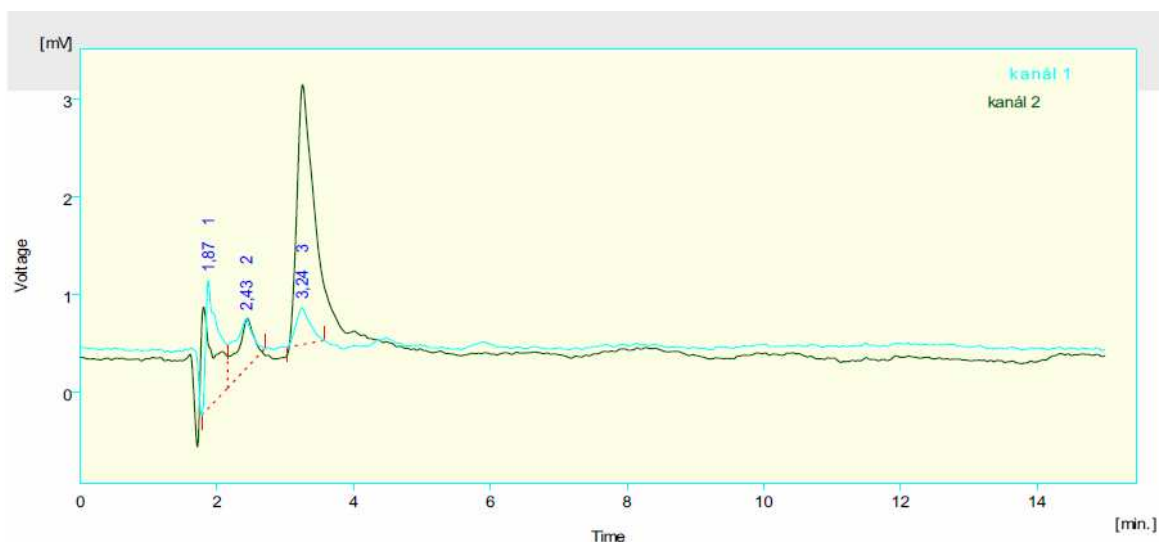


Obr. 21 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 400 \text{ mV}$ ,  $E2 = 500 \text{ mV}$

Tabulka 6 - Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 1

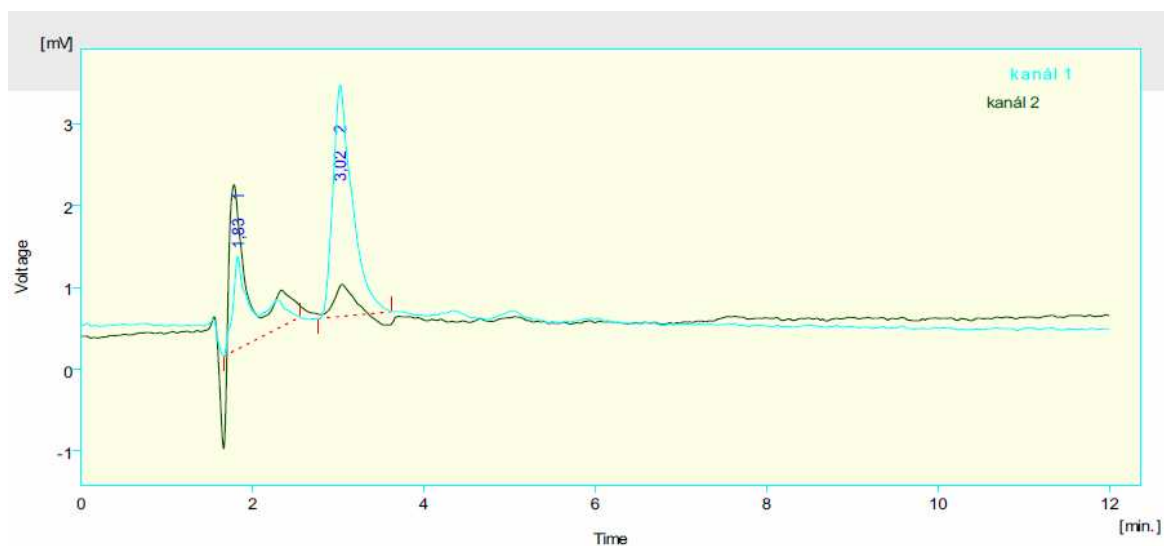
Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH : rH <sub>2</sub> O 30 : 1 : 69	Kyselina octová v redestilované vodě; 100 μg · ml <sup>-1</sup>	700, 800	+
		600, 700	+

Vzorek kyseliny octové v redestilované vodě vykazoval pozitivní odezvu v retenčním čase 3,24 min při nastavení parametru detektoru E1 = 600 mV, E2 = 700 mV (obr. 22).



Obr. 22 – Chromatogram: Standard kyseliny octové (100 μg · ml<sup>-1</sup>), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru E1 = 600 mV, E2 = 700 mV

Po změnách parametrů detektoru na E1 = 700 mV, E2 = 800mV, byl v čase ( $t_R = 3,02$  min) zaznamenán pík kyseliny octové (obr. 23).



Obr. 23 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$

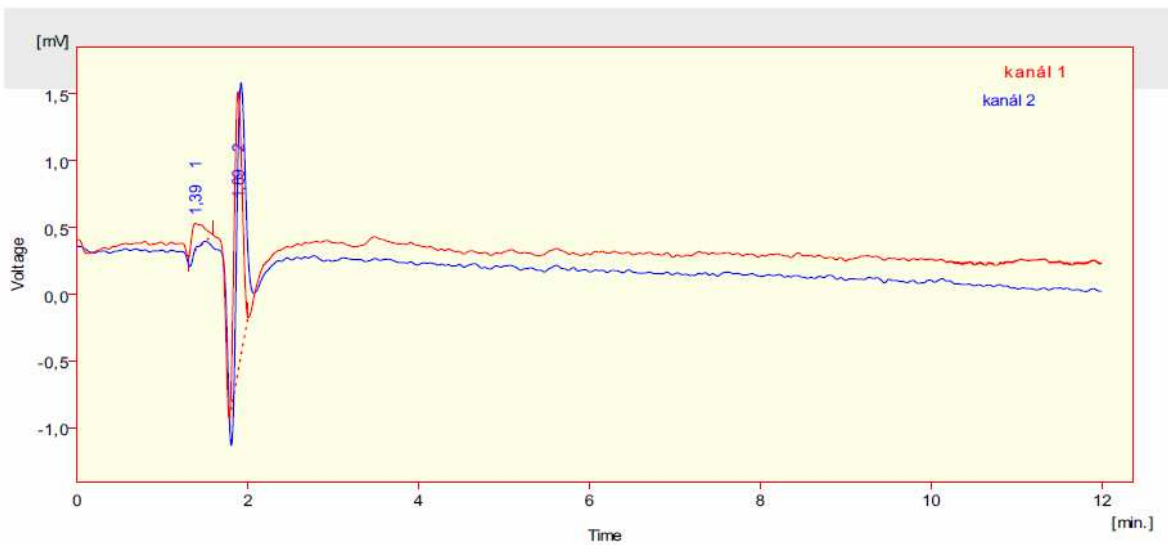
#### 4.1.4 Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 2

Tabulka 7 – Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 2

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina octová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	500, 600	-
		100, -100	-
		-500, -600	-
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 0,5 : 99 : 0,5	Kyselina octová v mobilní fázi; $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	100, -100	-
		-500, -600	-

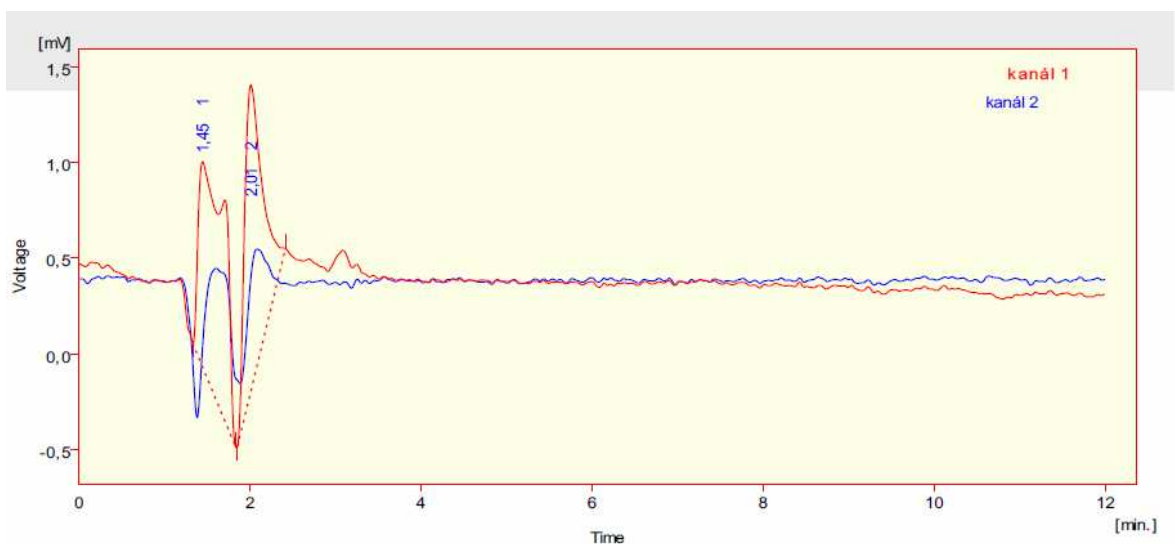
Z charakteru odezvy zaznamenaného v tabulce 7 je zřejmé, že uvedené podmínky nebyly vhodné pro stanovení kyseliny octové v mobilní fázi 2. Obrázek 24 popisuje průběh stanovení kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) v mobilní fázi při nastavení  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ . V tomto případě byla zaznamenána jen odezva mobilní fáze.





Obr. 24 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$

V obrázku 25 je znázorněn průběh stanovení vzorku kyseliny octové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) v mobilní fázi 2 při nastavení  $E1 = -500 \text{ mV}$  a  $E2 = -600 \text{ mV}$ . Stejně jako u předchozího chromatografu byla zaznamenána jen odezva mobilní fáze.



Obr. 25- Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = -500 \text{ mV}$ ,  $E2 = -600 \text{ mV}$

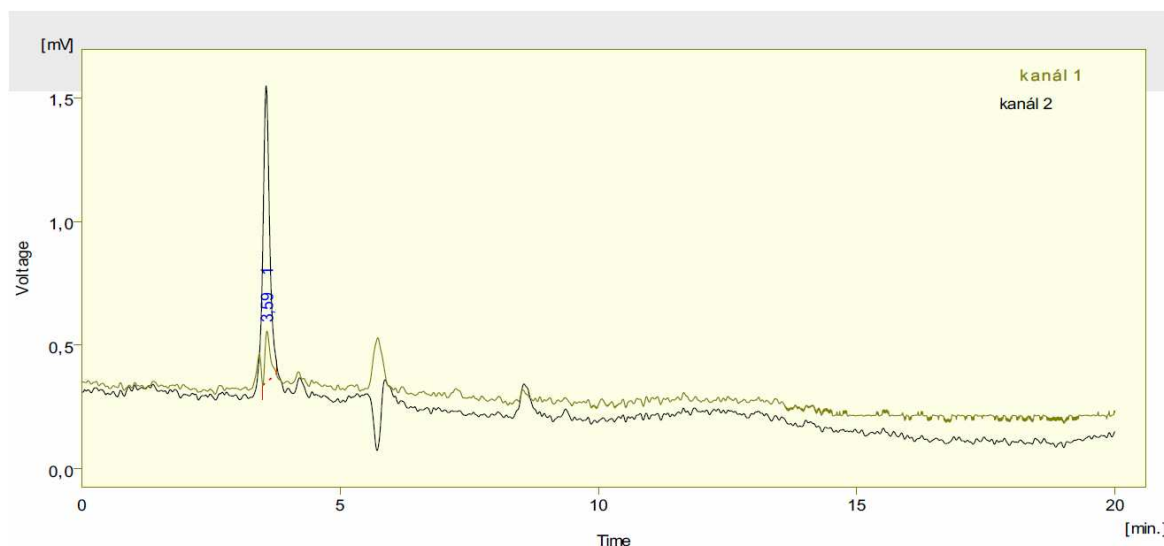
## 4.2 Možnosti detekce kyseliny citronové a octové na koloně DISCOVERY C18 pomocí ECD

### 4.2.1 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 1

Tabulka 8 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 1

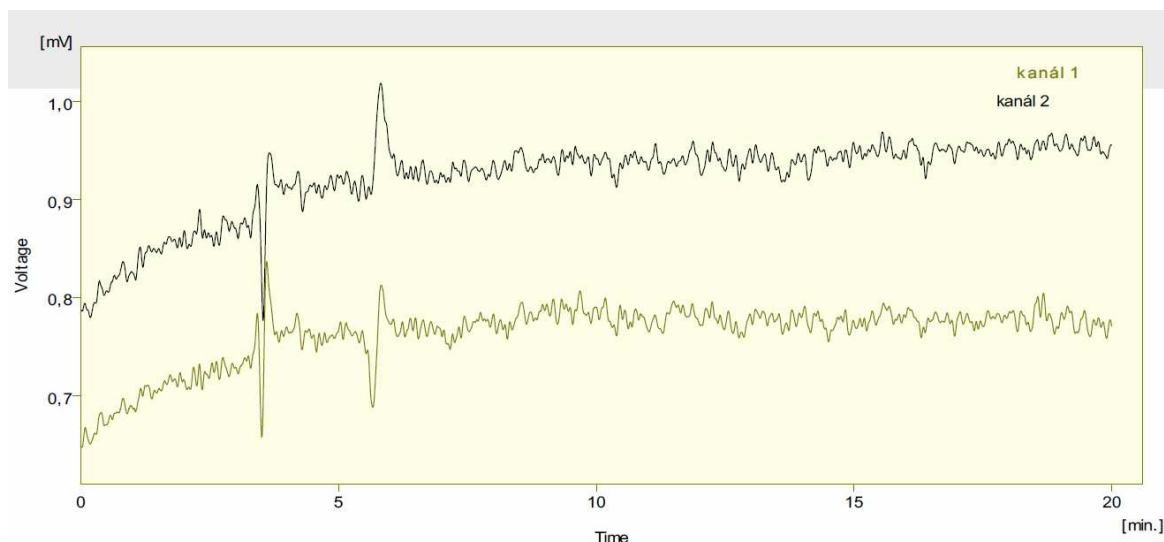
Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina citronová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	500, 600	-
		400, 500	-
		300, 400	-
		100, 200	-

Vzorek kyseliny citronové byl rozpuštěn v mobilní fázi 1 a stanoven za podmínek, jaké jsou uvedené v tabulce 8. Při nastavení těchto podmínek nebyl zaznamenán žádný pozitivní výsledek (obr. 26).



Obr. 26 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$

Při změně nastavení parametrů detektoru na nižší hodnoty (tabulka 8), nebyla opět zaznamenána odezva kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).



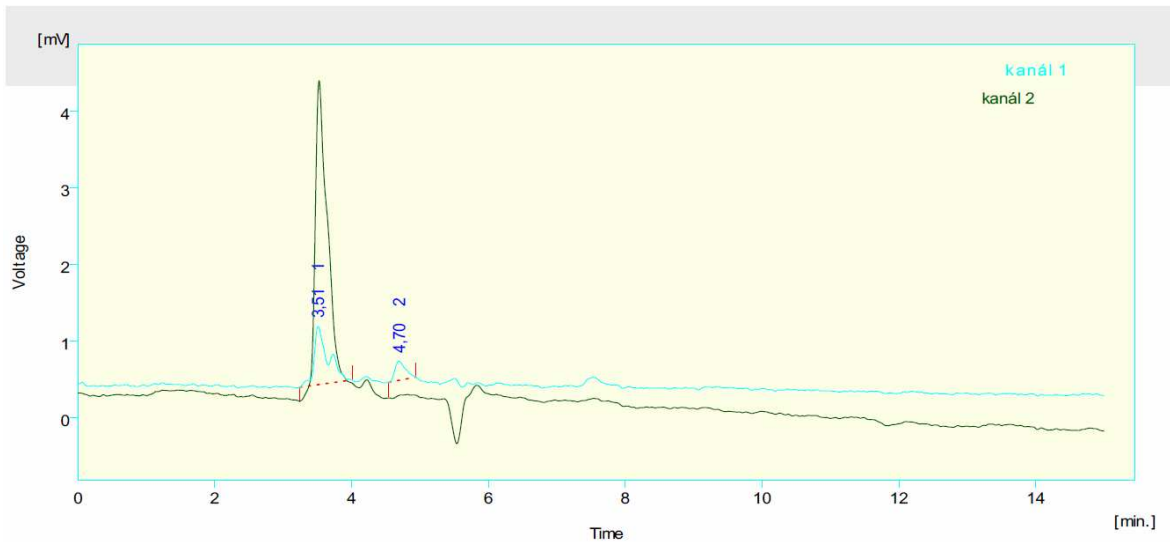
Obr. 27 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$

#### 4.2.2 Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 1

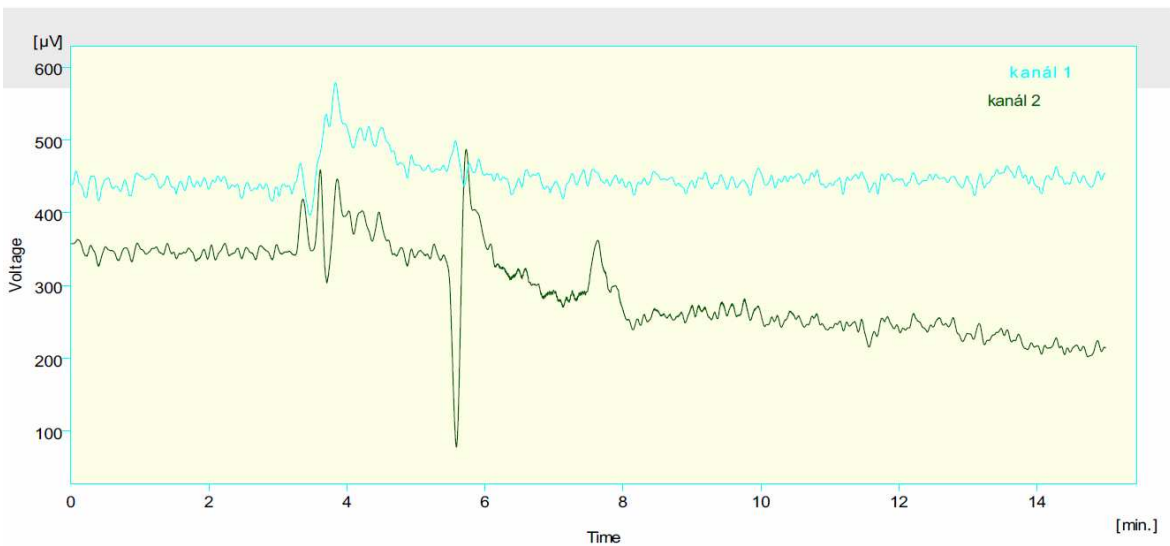
Tabulka 9 – Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 1

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina octová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	700, 800	+
		600, 700	-
		500, 600	-
		400, 500	-
		300, 400	-
		100, 200	-
		-100, 100	-
		-200, -100	-

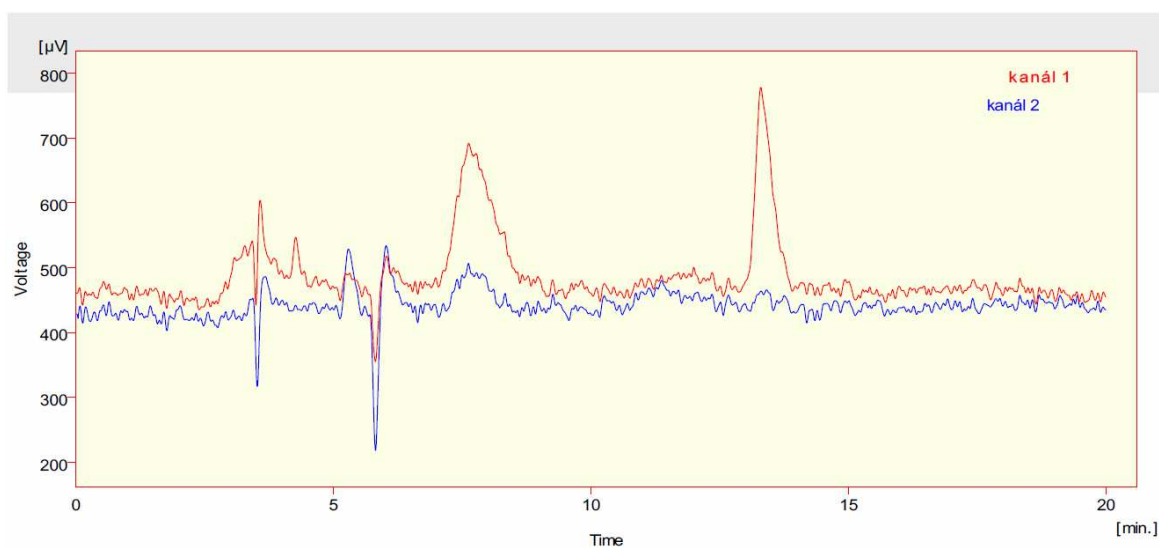
Vzorek kyseliny octové v mobilní fázi 1 nevykazoval za podmínek uvedených v tabulce 9 žádnou odezvu (obr. 29, 30). Na obrázku 28 je v retenčním čase 4,70 min zaznamenána velmi slabá odezva kyseliny octové.



Obr. 28 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$



Obr. 29 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$

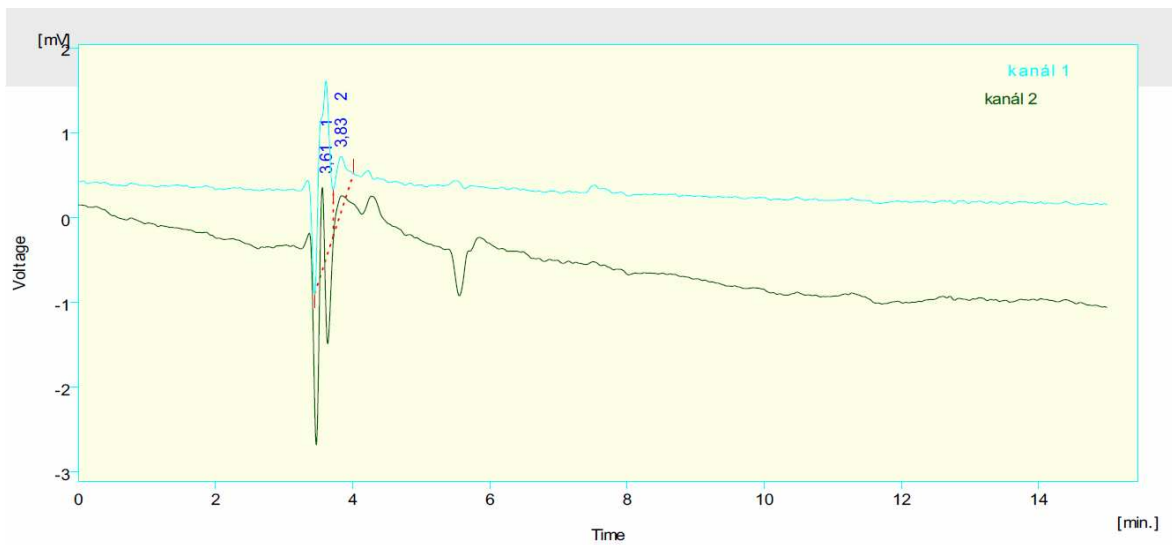


Obr. 30 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$

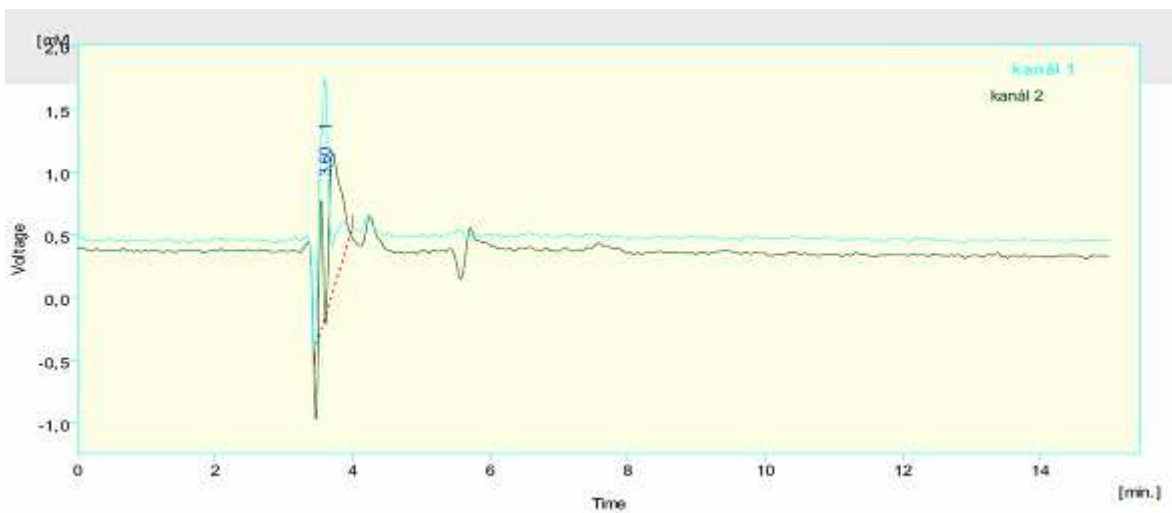
Tabulka 10- Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 1

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
$\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$ 30 : 1 : 69	Kyselina octová v redestilované vodě; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	700, 800	-
		600, 700	-
		500, 600	-

Z charakteru odezvy (tabulka 10) vyplývá, že vzorek nevykazoval žádnou odezvu za uvedených podmínek (obr. 31, 32).



Obr. 31 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$



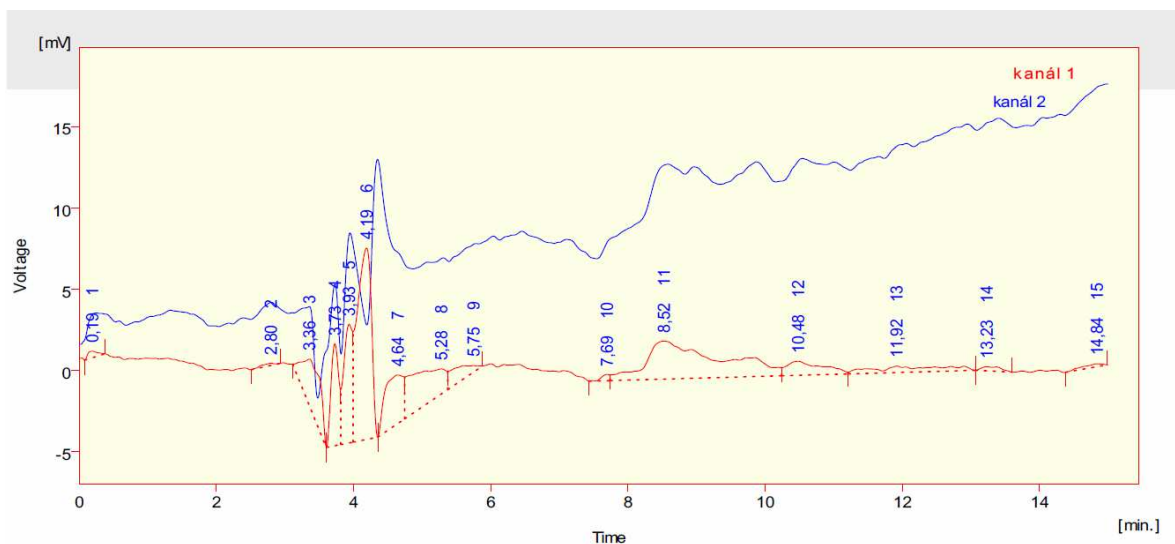
Obr. 32 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$

### 4.2.3 Stanovení kyseliny citronové s použitím mobilní fáze 3

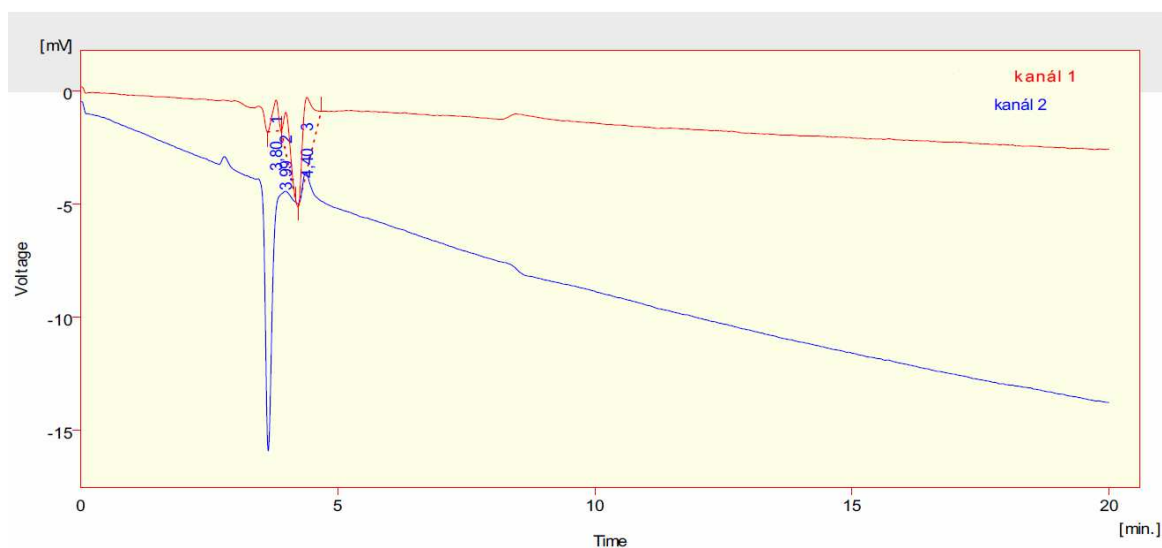
Tabulka 11 – Podmínky měření kyseliny citronové s mobilní fází 3

Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
MDTM	Kyselina citronová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	500, 600	-
		100, 200	-

Byla použita mobilní fáze pro stanovení biogenních aminů, která je ovšem pro stanovení kyseliny citronové nevhodná (obr. 33, 34).



Obr. 33 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV



Obr. 34 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$

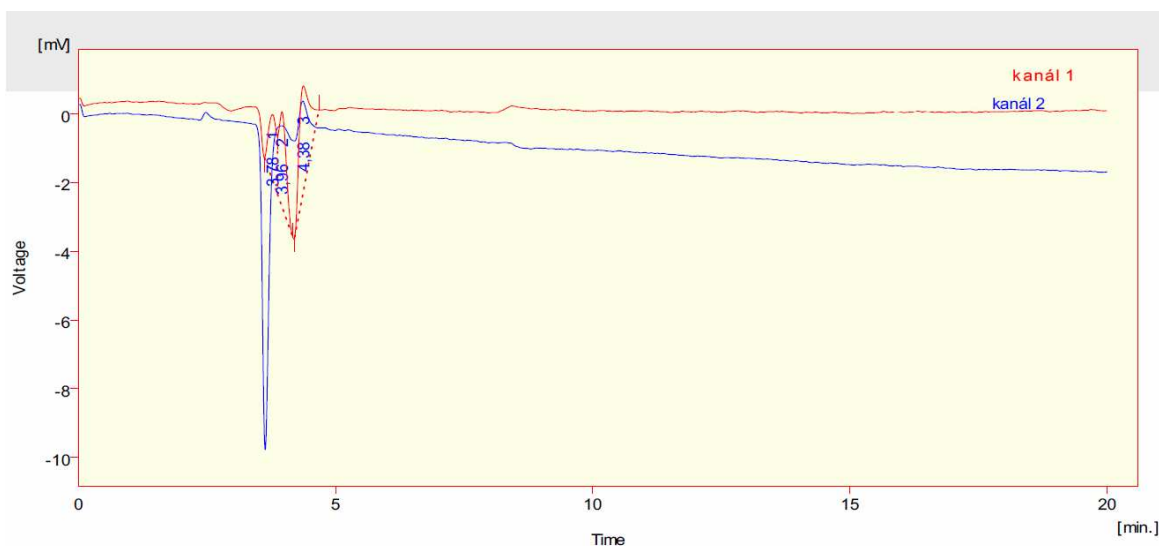
#### 4.2.4 Stanovení kyseliny octové s použitím mobilní fáze 3

Tabulka 12 – Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 3

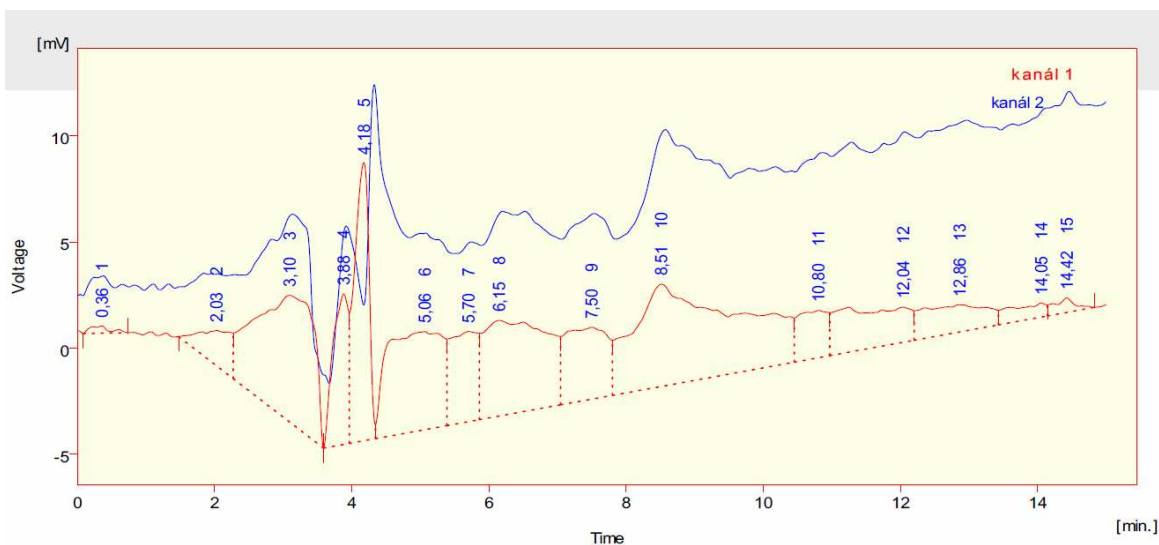
Mobilní fáze	Vzorek a koncentrace	Parametry detektoru E1, E2 [mV]	Charakter odezvy
MDTM	Kyselina octová v mobilní fázi; $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	500, 600	-
		100, 200	-

Mobilní fáze 3 nebyla vhodná ani pro stanovení kyseliny octové (obr. 35, 36).





Obr. 35 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$



Obr. 36 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$

### 4.3 Možnosti detekce kyseliny citronové a octové na koloně SUPELCOSIL LC8 pomocí UV-VIS

Vzorky kyseliny citronové a octové byly změřeny také na přístroji HPLC UV-VIS s použitím kolony SUPELCOSIL LC8 (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ ) a mobilní fáze 1 složené z 0,1 mol  $\cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ , metanolu a redestilované vody v poměru 30 : 1 : 69. Byly připraveny

dva typy vzorků každé kyseliny. První vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi a druhý v redestilované vodě vždy  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Všechny vzorky byly stanoveny za podmínek:  $P = 54 \text{ bar}$ ,  $t = 25^\circ \text{C}$ , průtok =  $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $\lambda = 210, 215, 230 \text{ nm}$ . Při měření kyseliny citronové rozpuštěné v mobilní fázi bylo zjištěno, že nastavené podmínky byly vhodné pro stanovení (příloha I). Stejně podmínky byly nastaveny při detekci roztoku kyseliny octové a mobilní fáze, které byly rovněž vyhovující (příloha II). Slabá odezva byla zaznamenána při měření kyseliny citronové (příloha III) i octové (příloha IV) rozpuštěné v redestilované vodě, ale přesto lze tyto podmínky považovat za vhodné. Na základě provedených měření bylo zjištěno, že jako vhodnější pro stanovení se jeví roztok vzorku kyseliny a mobilní fáze.

#### 4.4 Diskuse

Pro stanovení organických kyselin v bílém víně a v sýrech bylo zjištěno, že jako vhodné se jeví použití C18 kolon [41], 0[42]. Vzhledem k vybavení laboratoří byla zkoušena vhodnost dvou chromatografických kolon, kolona ASCENTIS C18 (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), kolona DISCOVERY C18 (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ) za použití třech různých mobilních fází.

Pro stanovení kyseliny citronové se jako nejvhodnější jevila kolona ASCENTIS C18 při použití mobilní fáze 1 tvořené  $\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$  v poměru 30 : 1 : 69, která byla zvolena na základě práce Radin L. (1994) [43], který ji použil při stanovení kyseliny vinné ve víně. Nejsilnější odezva kyseliny citronové byla zaznamenána při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$  a  $E2 = 800 \text{ mV}$ . Při snižování napětí se odezva kyseliny snižovala. Tato mobilní fáze byla použita i pro měření s kolonou DISCOVERY C18, ale v této sadě měření nebyly zaznamenány žádné odezvy stanovené kyseliny. Jediné zjištěné píky odpovídaly použité mobilní fázi.

V druhé sadě měření s kolonou ASCENTIS C18, lišící se pouze poměrem složek mobilní fáze (85%  $\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O}$  v poměru 0,5 : 99 : 0,5) odezva kyseliny citronové nebyla zaznamenána. Posledním zkoušeným způsobem detekce kyseliny citronové bylo použití kolony DISCOVERY C18 a mobilní fáze MDTM, která se využívá pro stanovení biogenních aminů. Při měření byly v různých retenčních časech zaznamenány slabé odezvy, ale domníváme se, že se jednalo o odezvy jednotlivých složek

této mobilní fáze a nebylo možné určit, zda byla zaznamenána i odezva kyseliny. Z tohoto důvodu se použití mobilní fáze MDTM pro stanovení daných kyselin jeví jako nevhodné.

Pro stanovení kyseliny octové byly použity stejné mobilní fáze a stejné kolony. Při použití mobilní fáze  $\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  v poměru 30 : 1 : 69 a kolony ASCENTIS C18 byla zaznamenána odezva kyseliny octové při nastavení parametrů detektoru ( $E_1 = 600$  mV,  $E_2 = 700$  mV) a ( $E_1 = 700$  mV,  $E_2 = 800$  mV). Při změně mobilní fáze na 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$  v poměru 0,5 : 99 : 0,5 nebyla odezva kyseliny octové zaznamenána, z čehož vyplývá, že použití této mobilní fáze je nevhodné.

V případě použití kolony DISCOVERY C18 se stejnými mobilními fázemi, jaké byly použity při stanovení kyseliny citronové nebyly zjištěny žádné výsledky, použitelné pro určení přítomnosti kyseliny.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce, bylo najít vhodné podmínky pro stanovení kyseliny citronové a octové. Pro měření byla použita metoda HPLC s elektrochemickou detekcí.

Metodou HPLC – ECD byl standard kyseliny citronové stanoven za podmínek použití kolony ASCENTIS C18 s použitím mobilní fáze složené z 0,1 mol · dm<sup>-3</sup> kyseliny fosforečné (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), metanolu (CH<sub>3</sub>OH) a redestilované vody (rH<sub>2</sub>O) v poměru 30 : 1 : 69 při nastavení parametru detektoru E1 = 700 mV a E2 = 800 mV. Pro stanovení kyseliny octové se jako nejvhodnější jeví použití kolony ASCENTIS C18 a mobilní fáze tvořené H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O v poměru 30 : 1 : 69 při nastavení parametrů detektoru (E1 = 600 mV, E2 = 700 mV) a (E1 = 700 mV, E2 = 800 mV).

Metodou HPLC UV-VIS byly obě kyseliny stanoveny při použití kolony SUPELCOSIL LC8 a mobilní fáze 1 složené z 0,1 mol · dm<sup>-3</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, metanolu a redestilované vody v poměru 30 : 1 : 69 při nastavení detektoru  $\lambda = 210$  nm, 215 nm a 230 nm.

Konfigurace a výsledky všech sad měření, které byly provedeny, jsou uvedeny v tabulkách v praktické části této práce. V práci jsou uvedeny chromatogramy všech pozitivních měření, ale pro názornost i chromatogramy některých neúspěšných měření.

Dosažené výsledky, by mohly být základem pro hledání dalších metod a způsobů detekce vybraných organických kyselin.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Organické kyseliny [online]. [cit. 30. 3. 2009]. Dostupné z www: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Organick%C3%A9\\_kyseliny](http://cs.wikipedia.org/wiki/Organick%C3%A9_kyseliny)>
- [2] KALACH, P. *Chemie potravin pro obchodně podnikatelský obor*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1999. ISBN: 80-7040-343-8.
- [3] JANEČKOVÁ, A., KLOUDA, P. *Organická chemie*. Ostrava: Pavel Klouda, 1998. ISBN: 80-902155-6-4/ 9802
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin II.*, Tábor: OSSIS, 1999. ISBN: 80-902391-4-5.
- [5] PELIKÁN, M., DUDÁŠ, F., MÍŠA, D. *Technologie kvasného průmyslu*. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004. ISBN: 80-7157-578-X
- [6] Analýza potravin přírodní látky, Distanční text [online]. [cit. 4. 4. 2009] dostupné z www: < [http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/CEs--AaDYQKq\\_JU155TwF5V69IgWjkzBBdP2GYzwwAI1/M0028\\_chemie\\_a\\_analyza\\_potravin%5Cdistancni\\_text\\_II%5CM0028\\_chemie\\_a\\_analyza\\_potravin\\_distancni\\_text\\_II.pdf](http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/CEs--AaDYQKq_JU155TwF5V69IgWjkzBBdP2GYzwwAI1/M0028_chemie_a_analyza_potravin%5Cdistancni_text_II%5CM0028_chemie_a_analyza_potravin_distancni_text_II.pdf)>
- [7] KYZLINK, V. *Principles of food preservation*. University of chemical technologies, Prague: 1990. ISBN: 0-444-9884-0
- [8] KOPEC, K. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN: 80-86153-64-9
- [9] HOZA, I., VALÁŠEK, P., ROP, O. *Teoretické principy konzervace potravin I. Hlavní konzervařenské suroviny*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN: 80-7318-339-0
- [10] INGR, I. *Základy konzervace potravin*. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN: 978-80-7375-110-4
- [11] Státní zdravotnický ústav: Přidatné látky v potravinách [online]. [cit. 1. 4. 2009]. Dostupné z www: <<http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach-1>>

- [12] Vyhláška ministerstva zdravotnictví 304/2004 [online]. [cit. 4. 4. 2009] dostupné z www: <<http://web.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/2004/sb100-04.pdf>>
- [13] YIGITOGUL, M. Production of citric acid by fungi. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 1992, 5:2, s. 100 – 106,
- [14] MAGNUSON, J., LASURE, L. Organic acid production by FilamentousFungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, 2004, s. 307-325
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin III.*, Tábor: OSSIS, 1999. ISBN: 80-902391-5-3.
- [16] LOWENSTEIN, J. *Citric acid cycle*. New York: Marcel Dekker, 1969
- [17] PACÁK, J. *Jak porozumět organické chemii*. Praha: Karolinum, 2007. ISBN: 978-80-246-1654-3
- [18] PEŠEK, M., ČURN, V., PELIKÁN, M., SAKOVÁ, L., JIROTKOVÁ, D. *Potravinářské zbožíznalectví*. Budějovice: Jihočeská univerzita, 2000. ISBN: 80-7040-399-3
- [19] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*. Brno: MIKADAPRESS, 2006. ISBN: 80-7013-435-6
- [20] CHLEBOVSKÝ, T. *Organická chemie a vybrané kapitoly organické technologie*. Ostrava: Ediční středisko VŠB, 1971.
- [21] VOET, D., VOETOVÁ, J. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995, ISBN: 80-85605-44-9
- [22] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*. Praha: nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN: 80-03-00569-8
- [23] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Klouda Pavel, 2003. ISBN: 80-86369-07-2
- [24] JANDERA, P., CHURÁČEK, J. *Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze*. Praha: nakladatelství Československé akademie věd, 1984.

- [25] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN: 80-246-0553-8
- [26] WESTON, A. *HPLC and CE, Principles and Practice*, Sunnyvale: Saunders company, 1997, ISBN: 0-12-136640-5
- [27] ŠTULÍK, K. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN: 80-246-0852-9
- [28] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: nakladatelství technické literatury, 1984
- [29] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*. Bratislava: Pravda, 1979
- [30] HPLC kolona [online]. [cit. 10. 4. 2009] dostupné z www: <http://hplc.sweb.cz/index1.html>
- [31] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody – učebnice základních instrumentálních analytických metod*. Ostrava: Klouda Pavel, 1996. ISBN: 80-902155-0-5
- [32] DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002, ISBN: 80-86584-09-0
- [33] Krystalická kyselina citronová [online]. [cit. 25. 3. 2009] dostupné z www: <http://fj.chinamarket.com.cn/webfjzq/en/info/tradeleadSell/findTradeLeadSellSimple.do?categoryId=28057424>
- [34] Schéma kapalinového chromatogramu [online]. [cit. 15. 4. 2009] Dostupné z www: [http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa\\_soubory/image004.jpg](http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa_soubory/image004.jpg)
- [35] Schéma chromatografické kolony: [online]. [cit. 19. 4. 2009] dostupné z www: [http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/collumn\\_hardware.gif](http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/collumn_hardware.gif)

- [36] Schéma detektorů [online]. [cit. 15. 4. 2009] Dostupné z www: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [37] Coulochem III [online]. [cit. 22. 4. 2009] Dostupné z www: [http://www.bmskorea.co.kr/bms\\_Product/MakerImage/esa/coulochem-3-3.jpg](http://www.bmskorea.co.kr/bms_Product/MakerImage/esa/coulochem-3-3.jpg)
- [38] Kordiř-Krapeř M., Abram V., Kač M., Ferjančič S. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. *Food technology Biotechnology*. 2001, 39 s. 93-99
- [39] DINKCI N., AKALIN A. S., Gönc S., ÜNAL G. Isocratic reverse-phase HPLC for determination of organic acids in kargi tulum cheese, *Chromatographia Supplement*, 2007, Vol. 66, s. 45-49
- [40] 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*, Volume <http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597273~db=all~tab=issueslist~branches=17-v1717>, 1994, 10, s. 2231 - 2246
- [41] Kordiř-Krapeř M., Abram V., Kač M., Ferjančič S. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. *Food technology Biotechnology*. 2001, 39 (2) 93-99
- [42] DINKCI N., AKALIN A. S., Gönc S., ÜNAL G. Isocratic reverse-phase HPLC for determination of organic acids in kargi tulum cheese, *Chromatographia Supplement*, 2007, Vol. 66, 45-49
- [43] 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*, Volume <http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597273~db=all~tab=issueslist~branches=17-v1717>, Issue 10 June 1994, pages 2231 - 2246



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

LC	Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie
GC	Gas Chromatography , plynová chromatografie
PC	Paper Chromatography, papírová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography, tenkovrstvá chromatografie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, High Pressure Liquid Chromatography, vysokoúčinná chromatografie
UV-VIS	Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla
RI	Refractive Index, RI detektor - Refraktometrický detektor
FLD	Fluorescence Detector , Fluorimetrický detektor
ECD	Elektrochemical Detector, elektrochemický detektor
DAD	Diode Array Detector, detektor s diodovým polem

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 – Krystalická kyselina citronová [33].....	16
Obr. 2 – Ledová kyselina octová [1].....	18
Obr. 3 – Schéma kapalinového chromatografu [34].....	26
Obr. 4 – Dávkovací ventil [25] .....	27
Obr. 5 – Chromatografická kolona Ascentis C18.....	28
Obr. 6 – Schéma chromatografické kolony [35].....	28
Obr. 7 - Chromatogram.....	29
Obr. 8 – Schéma fotometrického detektoru [36] .....	30
Obr. 9 – Schéma refraktometrického detektoru [36] .....	31
Obr. 10 – Schéma fluorimetrického detektoru [36].....	32
Obr. 11 – Coulochem III [37] .....	33
Obr. 12 – Grafické znázornění šumu a driftu [32].....	34
Obr. 13 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$ , $E2 = 600 \text{ mV}$ .....	40
Obr. 14 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 600 \text{ mV}$ , $E2 = 700 \text{ mV}$ .....	41
Obr. 15 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 700 \text{ mV}$ , $E2 = 800 \text{ mV}$ .....	42
Obr. 16 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 300 \text{ mV}$ , $E2 = 400 \text{ mV}$ .....	42
Obr. 17 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru $E1 = - 500 \text{ mV}$ , $E2 = - 600 \text{ mV}$ .....	44
Obr. 18 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$ , $E2 = 600 \text{ mV}$ .....	44
Obr. 19 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 100 \text{ mV}$ , $E2 = - 100 \text{ mV}$ .....	45
Obr. 20 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 500 \text{ mV}$ , $E2 = 600 \text{ mV}$ .....	46
Obr. 21 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru $E1 = 400 \text{ mV}$ , $E2 = 500 \text{ mV}$ .....	46

- Obr. 22 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 600 \text{ mV}$ ,  $E2 = 700 \text{ mV}$ ..... 47
- Obr. 23 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$ ..... 48
- Obr. 24 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 49
- Obr. 25- Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 2 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = - 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = - 600 \text{ mV}$ ..... 49
- Obr. 26 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 50
- Obr. 27 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$ ..... 51
- Obr. 28 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$ ..... 52
- Obr. 29 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 52
- Obr. 30 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$ ..... 53
- Obr. 31 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 700 \text{ mV}$ ,  $E2 = 800 \text{ mV}$ ..... 54
- Obr. 32 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 54
- Obr. 33 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 55
- Obr. 34 – Chromatogram: Standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$ ..... 56
- Obr. 35 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ..... 57
- Obr. 36 – Chromatogram: Standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 3 při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 100 \text{ mV}$ ,  $E2 = 200 \text{ mV}$ ..... 57

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Obsah kyseliny citronové v ovoci a zelenině [4].....	16
Tabulka 2 - Srovnání použitelnosti HPLC a ostatních metod [27].....	23
Tabulka 3 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 1 .....	39
Tabulka 4 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 2.....	43
Tabulka 5 – Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 1 .....	45
Tabulka 6 - Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 1 .....	47
Tabulka 7 – Podmínky měření kyseliny octové v mobilní fázi 2 .....	48
Tabulka 8 – Podmínky měření kyseliny citronové v mobilní fázi 1 .....	50
Tabulka 9 – Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 1 .....	51
Tabulka 10- Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 1.....	53
Tabulka 11 – Podmínky měření kyseliny citronové s mobilní fází 3 .....	55
Tabulka 12 – Podmínky měření kyseliny octové s mobilní fází 3.....	56

## SEZNAM PŘÍLOH

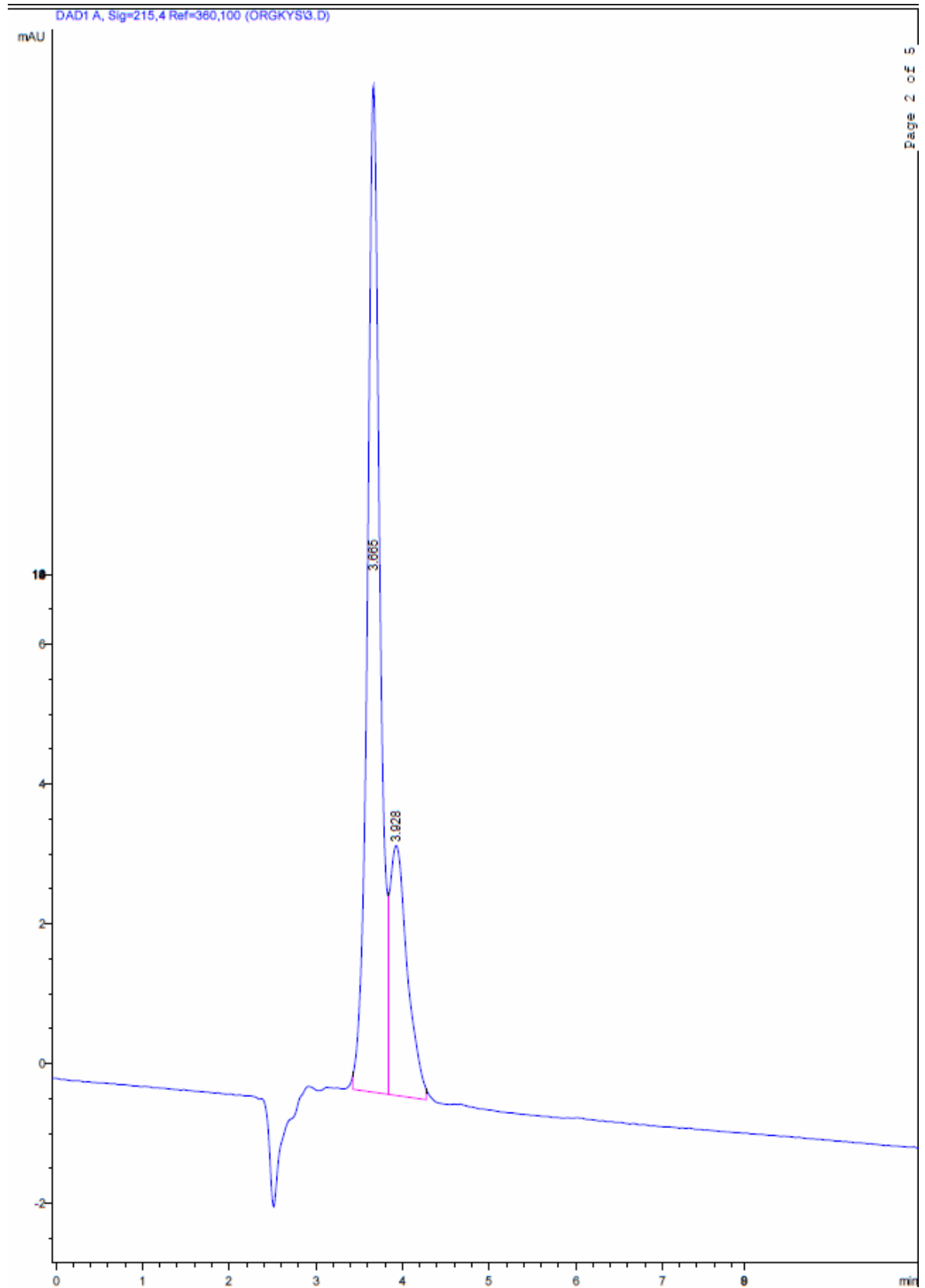
Příloha I: Chromatogram: standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení detektoru  $N = 215 \text{ nm}$

Příloha II: Chromatogram: standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení detektoru  $N = 210 \text{ nm}$

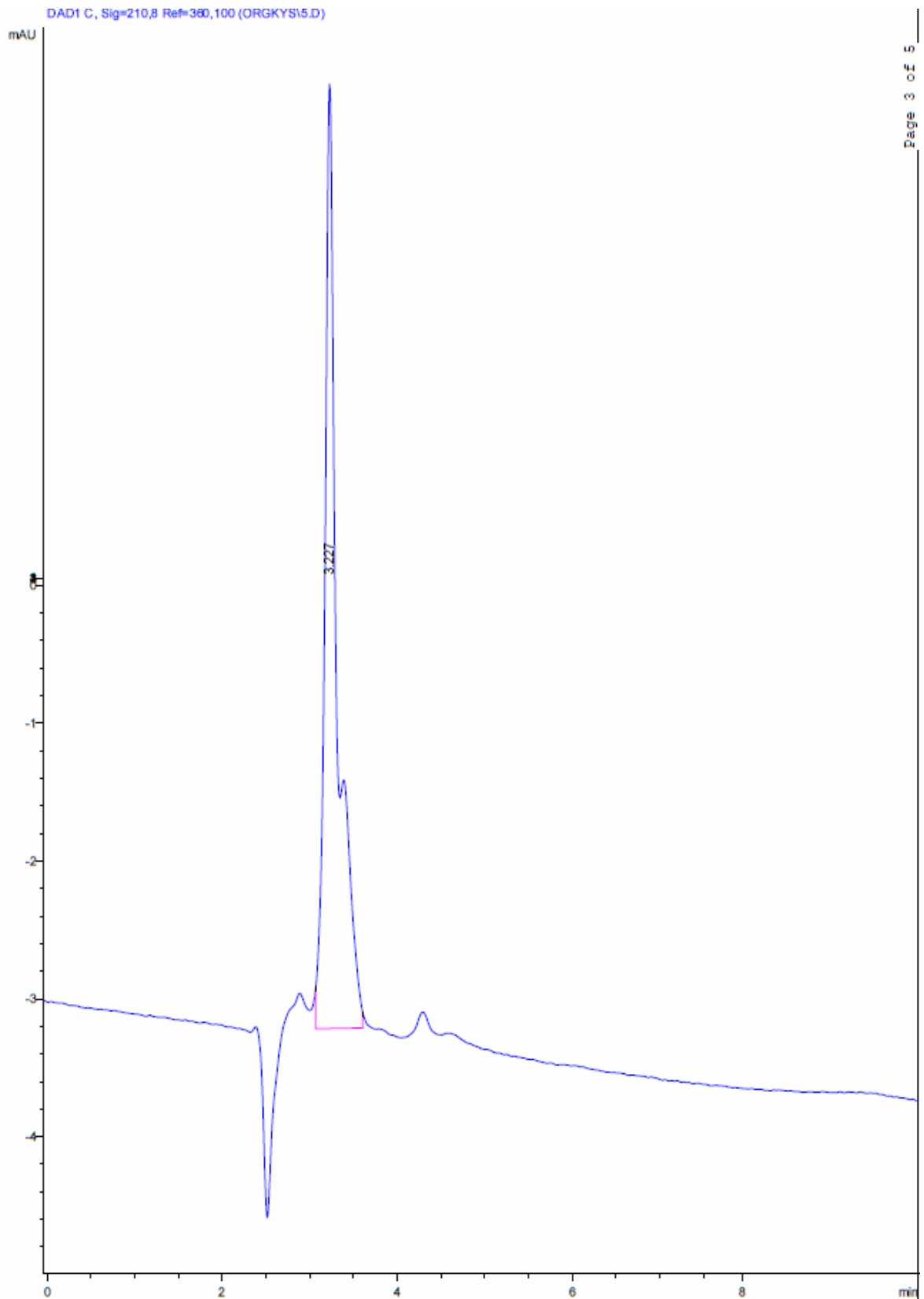
Příloha III: Chromatogram: standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití redestilované vody při nastavení detektoru  $N = 230 \text{ nm}$

Příloha IV: Chromatogram: standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití redestilované vody při nastavení detektoru  $N = 210 \text{ nm}$

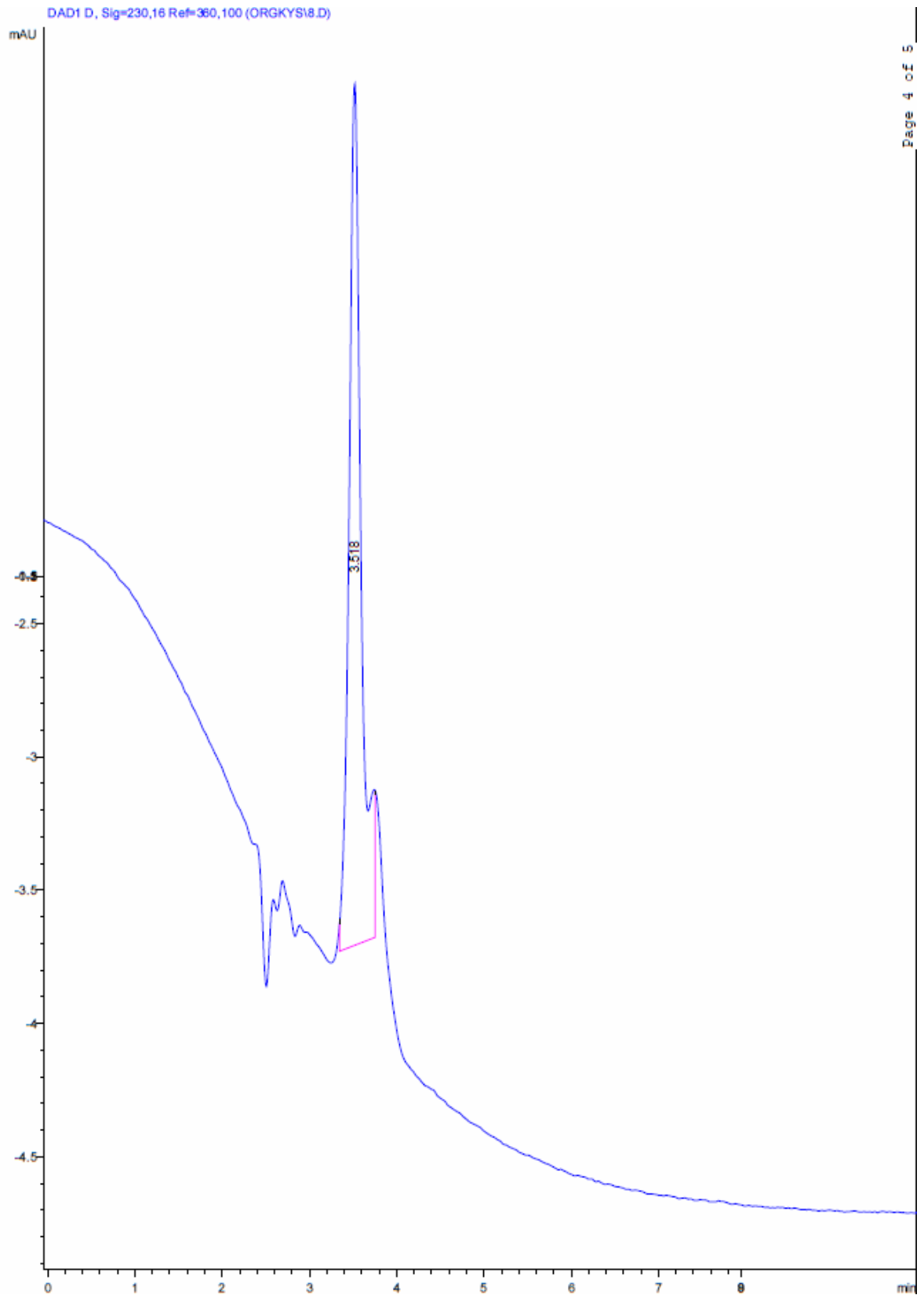
**PŘÍLOHA I: Chromatogram: standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití mobilní fáze 1 při nastavení detektoru  $N = 215 \text{ nm}$**



**PŘÍLOHA II: Chromatogram: standard kyseliny octové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  
za použití mobilní fáze 1 při nastavení detektoru  $N = 210 \text{ nm}$**



**PŘÍLOHA III: Chromatogram: standard kyseliny citronové ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), za použití redestilované vody při nastavení detektoru  $N = 230 \text{ nm}$**





**PŘÍLOHA IV: Chromatogram: standard kyseliny octové (100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  
za použití redestilované vody při nastavení detektoru N = 210 nm**

