

Možnosti analýzy sacharidů s využitím HPLC-RI

Erika Čechová

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Erika Čechová**
Osobní číslo: **T13833**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti analýzy sacharidů s využitím HPLC-RI**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte sacharidy a možnosti jejich stanovení
2. Popište principy HPLC a refraktometrické detekce
3. Charakterizujte způsoby přípravy vzorku z různých potravin pro chromatografické stanovení sacharidů
4. Charakterizujte možnosti stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI v různých potravinách

II. Praktická část

1. Optimalizujte metodiku pro stanovení vybraných sacharidů pomocí HPLC-RI
2. Navrhněte extrakční postup pro analýzu sacharidů ve vybraných potravinách
3. Stanovte sacharidy ve vybraných potravinách pomocí HPLC-RI
4. Získané výsledky diskutujte s odbornou literaturou

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] LUZ SANS María a Isabel MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1153, 7489. ISSN 0021-9673
- [2] RAESSLER Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30, 18331843. ISSN 0165-9936
- [3] FOLKES D.J. a M.A. JORDAN. Mono- and disacharides: Analytical aspects. In: ELIASSON Ann-Charlotte, ed. *Carbohydrates in Food*, Second Edition. Boca Raton: CRC Press, 2006, s. 140. ISBN 978-0-8247-5942-1
- [4] PERIS-TORTAJADA Miguel. HPLC determination of carbohydrates in food. In: NOLLET Leo M.L. a Fidel TOLDRÁ, eds. *Food Analysis by HPLC*, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2013, s. 233252. ISBN 978-1-4398-3084-0
- [5] ZAKHAROVA A.M., I.L. GRINSHEIN a L.A. KARTSOVA. Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 68, 10811084. ISSN 1061-9348

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2016

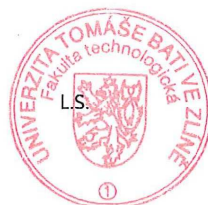
Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ČECHOVÁ ERIKA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2016



¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá metodami analýzy sacharidů pomocí HPLC-RI. Teoretická část zahrnuje obecnou charakteristiku sacharidů a jejich vlastností, možné extrakce sacharidů a metody stanovení sacharidů. Dále je v práci popsána příprava vzorků (extrakce a čiření) pro stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI. Následné stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI zahrnuje obecný popis této chromatografické metody spolu s charakteristikou používaných detektorů, s důrazem zejména na refraktometrickou detekci. Závěrečná kapitola teoretické části pojednává o vlastním stanovení cukrů ve vybraných potravinách pomocí HPLC-RI. V praktické části bakalářské práce byla nejdříve optimalizována příprava vzorku pro následné chromatografické stanovení mono- a oligosacharidů. Z testovaných čiřidel byla jako nejvhodnější zvolena Carrezova činidla. Pro tuhé a polotuhé vzorky byla vybrána teplota extrakce 50 °C. Barevné vzorky byly podrobeny extrakci na pevné fázi. Následně byly cukry stanoveny ve vybraných potravinách dostupných v běžné tržní síti (ovocné sirupy, šťávy a nápoje, energetické nápoje, ovocné protlaky, med, kečup, hořčice, krekry a jiné) a zjištěné hodnoty byly porovnány s údaji uvedenými na obalech výrobků. Na základě zjištěných odchylek lze konstatovat, že navržený postup přípravy vzorků i následná metodika stanovení, jsou vhodné pro stanovení cukrů v analyzovaných potravinách.

Klíčová slova: monosacharidy, oligosacharidy, cukry, HPLC-RI, čiření, extrakce, optimalizace

ABSTRACT

This thesis deals with the methods of saccharides determination by HPLC-RI. The theoretical part includes general characteristic of saccharides and their properties, possible extraction of saccharides and methods of saccharides determination. The thesis describes the preparation of samples (extraction and clarification) for a saccharides determination by HPLC-RI. Subsequent saccharides determination by HPLC-RI includes a general description of this chromatographic method with the characteristics of detectors, with the emphasis on refractive detection. The final chapter of theoretical part is about saccharides determination by HPLC-RI in selected foodstuff. Sample preparation for the chromatographic determination of mono- and oligosaccharides was firstly optimized in the practical part of this thesis. Of the tested clarifiers Carrez reagents were chosen as the best option. Temperature of extraction 50 ° C was selected for solid and semi-solid samples. Coloured samples were cleaned also by solid phase extraction. Subsequently sugars were determined in selected foodstuff available in the current market network (fruit syrups, juices and drinks, energy drinks, fruit snacks, honey, ketchup, mustard, crackers, etc.) and the obtained values were compared with the data presented on the product packaging. Based on the deviation observed it can be stated, that the proposed samples preparation and subsequent chromatographic method is suitable for the sugar determinations in the foods analyzed.

Keywords: monosaccharides, oligosaccharides, sugars, HPLC-RI, clarification, extraction, optimization

Největší poděkování patří především vedoucí mé bakalářské práce paní Ing. Zuzaně Bube-
lové, Ph.D. a to za ochotu, trpělivost, cenné rady a také za praktickou pomoc během zpra-
cování práce. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Ing. Ludmile Zálešákové za
ochotu a pomoc v laboratoři. Chtěla bych poděkovat také mé rodině a přátelům za podporu
během studia. V poslední řadě bych chtěla poděkovat Radku Bartošíkovi za pomoc
v laboratoři.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná
do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 11 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 1 CHARAKTERISTIKA SACHARIDŮ A JEJICH STANOVENÍ | 14 |
| 1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA SACHARIDŮ..... | 14 |
| 1.2 EXTRAKCE SACHARIDŮ | 15 |
| 1.3 METODY STANOVENÍ SACHARIDŮ..... | 16 |
| 2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC | 17 |
| 2.1 EXTRAKCE VZORKU..... | 17 |
| 2.2 ČIŘENÍ VZORKU | 18 |
| 2.2.1 Čiření podle Carreze..... | 18 |
| 2.2.2 Čiření neutrálním octanem olovnatým | 18 |
| 2.2.3 Čiření zásaditým octanem olovnatým | 19 |
| 2.2.4 Čiření podle Herlese..... | 19 |
| 2.2.5 Čiření kyselinou fosfowolframovou..... | 19 |
| 2.2.6 Ostatní čiřící činidla | 19 |
| 3 STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC-RI | 20 |
| 3.1 PRINCIP HPLC | 20 |
| 3.1.1 Schéma kapalinového chromatografu | 20 |
| 3.1.2 Dávkovací zařízení HPLC..... | 21 |
| 3.1.3 Kolony pro HPLC | 22 |
| 3.1.4 Detektory pro HPLC | 23 |
| 3.1.4.1 Princip refraktometrické detekce HPLC | 23 |
| 4 STANOVENÍ CUKRŮ V RŮZNÝCH POTRAVINÁCH POMOCÍ HPLC-RI | 25 |
| 4.1.1 Mléko | 25 |
| 4.1.2 Mléčné výrobky..... | 26 |
| 4.1.3 Cukrovinky..... | 26 |
| 4.1.4 Ovocné nápoje..... | 27 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 28 |
| 5 CÍL PRÁCE | 29 |
| 6 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY | 30 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.1 | CHEMIKÁLIE | 30 |
| 6.2 | POMŮCKY A PŘÍSTROJE..... | 30 |
| 6.3 | ANALYZOVANÉ VZORKY | 31 |
| 6.4 | OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKŮ | 34 |
| 6.5 | PŘÍPRAVA VZORKŮ | 35 |
| 6.6 | ANALÝZA CUKRŮ POMOCÍ HPLC-RI..... | 35 |
| 7 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 37 |
| 7.1 | KALIBRAČNÍ KŘIVKY | 37 |
| 7.2 | VÝSLEDKY OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKŮ | 39 |
| 7.2.1 | Extrakce na pevné fázi | 39 |
| 7.2.2 | Optimalizace přípravy tekutých vzorků | 40 |
| 7.2.3 | Optimalizace přípravy polotuhých vzorků | 41 |
| 7.2.4 | Optimalizace přípravy tuhých vzorků | 42 |
| 7.3 | VÝSLEDKY STANOVENÍ CUKRŮ VE VYBRANÝCH POTRAVINÁCH..... | 44 |
| | ZÁVĚR | 49 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 50 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 54 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 55 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 56 |

ÚVOD

Sacharidy jsou biomolekuly, které obsahují ve své struktuře asymetrický uhlík, díky kterému jsou tyto látky opticky aktivní (stáčí rovinu polarizovaného světla). Z chemického hlediska jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony. Jako cukry se označují mono- a oligosacharidy. Společnou vlastností cukrů je jejich rozpustnost ve vodě a nasládlá chuť [1].

Metod stanovení sacharidů je velmi mnoho. Podstata stanovení spočívá jak v přípravě vzorku, tak i ve vlastním stanovení. Klíčovým krokem je však příprava vzorku. Nejdříve je nutné ze vzorku sacharidy vyizolovat. K tomuto účelu se používá separační metody extrakce, která slouží také k přečištění vzorku. V případě tuhých nebo polotuhých vzorků je před extrakcí nejdříve nutné vzorek rozmělnit. Kvalita a účinnost separace je dána vhodnou volbou rozpouštědla použitého pro extrakci. V případě špatně zvoleného extrakčního postupu dojde k vyizolování malého případně žádného množství sacharidů, což vede k neefektivitě extrakce. Po extrakci je důležité ze vzorku odstranit látky, které by rušily následné stanovení pomocí HPLC. Odstranění rušících elementů je uskutečňováno čiřením vzorku, pomocí čiřících činidel. Nejpoužívanější čiřící činidla jsou Carrezova činidla. Carrezova činidla se hojně používají z důvodu vysoké účinnosti při odstraňování bílkovin ze vzorku a také z důvodu účinnosti jak v kyselém, tak i v neutrálním prostředí [2,3].

Podmínky extrakce a čiření je možné optimalizovat. U vzorků, ze kterých se sacharidy špatně izolují, se extrakce provádí za použití vyšších teplot, čímž se usnadní přechod sacharidů do rozpouštědla. Další možnou volbou optimalizace metodiky je také vymrazování. Vymrazováním se snižuje, případně potlačuje nežádoucí metabolická aktivita některých enzymů. Čiření je možné zoptimalizovat vhodnou volbou čiřících činidel, případně jejich kombinací. Vzhledem k vysoké efektivitě čiření Carrezovými činidly je dobrá kombinace právě jich a ostatních čiřících činidel [2,3,4].

Vlastní stanovení je také možné různými metodami. Chromatografické metody jsou v případě stanovení sacharidů v dnešní době nejpoužívanější. Dřívější používanou metodu, chromatografii na tenké vrstvě, nahrazuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která, je-li doplněna o vhodné detektory umožňující stanovení, poskytne informace o kvalitativním i kvantitativním zastoupení jednotlivých sacharidů [5,6].

Tato práce je zaměřena na stanovení sacharidů z různých potravin pomocí HPLC-RI. Praktická část se zabývá i problematikou optimalizace metodiky přípravy vzorků pro stanovení sacharidů v různých typech potravin pomocí HPLC-RI.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA SACHARIDŮ A JEJICH STANOVENÍ

Sacharidy jsou základními složkami všech živých systémů. Jsou také nejrozšířenější skupinou organických látek. Z chemického hlediska jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony [1].

1.1 Obecná charakteristika sacharidů

Základní dělení sacharidů je na dvě hlavní skupiny, jednoduché a složené. Do skupiny jednoduchých sacharidů řadíme pouze monosacharidy, např. D-glukóza, D-galaktóza. Tyto sacharidy již není možné dále hydrolyticky štěpit na menší cukry. Monosacharidy lze dále dělit podle přítomné funkční skupiny na aldózy (aldehydová skupina) a ketózy (ketonová skupina). Složené sacharidy jsou složeny ze dvou a více monosacharidových jednotek spojených glykosidovými vazbami. Mezi složené sacharidy řadíme oligosacharidy a polysacharidy. Oligosacharidy obsahují dvě až deset monosacharidových jednotek. Např. sacharóza obsahuje dvě monosacharidové jednotky, a to D-glukózu a D-fruktózu. Polysacharidy jsou analogicky složeny z více než deseti monosacharidových jednotek [1,7]. Tato bakalářská práce se zabývá pouze cukry, tedy mono- a oligosacharidy.

Empirický vzorec většiny sacharidů, které jsou přítomny v potravinách, je $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Nejvíce jsou v potravinách zastoupeny mono- a oligosacharidy. Mono- a oligosacharidy jsou sacharidy rozpustné ve vodě, mající sladkou chuť. Tyto nízkomolekulární látky se označují jako cukry [8,9].

Cukry jsou obsaženy v téměř všech potravinách. Ve velkém množství jsou hlavně v ovoci. Nejčastějšími cukry, vyskytujícími se v potravinách, jsou glukóza, fruktóza, sacharóza, laktóza a maltóza. Glukóza, označovaná jako hroznový cukr, je přítomna ve volné formě hlavně v ovoci a medu. Její hladina v krvi člověka by se měla pohybovat v rozmezí 3,5 – 5,6 mmol.l⁻¹. Glukóza je aldohexóza, ve vázané formě je součástí některých oligo- a polysacharidů. Fruktóza, neboli ovocný cukr, je ketohexóza a je také přítomna v ovoci. Společně s glukózou je přidávána do potravin ve formě glukózo-fruktózového sirupu. Sacharóza je α -D-glukopyranosyl-(1→2)- β -fruktofuranosid. Je tedy tvořena molekulou glukózy a fruktózy. Vazba mezi glukózou a fruktózou je β (1→2). Sacharóza se nachází ve vegetativních částech rostlin a v plodech rostlin. Hlavní průmyslový zdroj sacharózy je cukrová třtina a cukrová řepa, proto se také nazývá jako řepný cukr. Sacharóza je neredukující disa-

charid. Laktóza, mléčný cukr, je obsažena v mléce a v mléčných výrobcích. U potravin upravených mléčným kvašením (např. jogurt) je její obsah nízký. Laktóza je složena z jednotky galaktózy a glukózy, je β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranóza. Vazba mezi galakózou a glukózou je tedy β (1 \rightarrow 4). Laktóza má oproti sacharóze volnou poloacetálovou skupinu na prvním uhlíku a je tedy redukující disacharid. Maltóza se nazývá jako sladový cukr. Je složena ze dvou glukózových jednotek a je α -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopyranóza. Vazba mezi těmito aldohexózami je α (1 \rightarrow 4). Je obsažena v klíčcích semen rostlin, ale také v medu. Maltóza obsahuje volnou poloacetálovou skupinu na prvním uhlíku jako laktóza, je tedy také redukující disacharid [1,10,11].

1.2 Extrakce sacharidů

Extrakce je nejstarší a nejjednodušší způsob čištění vzorku analytu od látek, které by rušily následné stanovení. Sacharidy jsou extrahovány použitím tradičních metod, jako je extrakce kapaliny kapalinou a extrakce pevné látky kapalinou. Srážení nežádoucích látek z roztoku se provádí různými činidly. Časté je použití Carrezových činidel. Tato činidla vysráží z roztoku proteiny nebo lipidy, které by rušily následné stanovení. Na podobném principu je také založené srážení kyselinou trichloroctovou, acetonitrilem nebo kyselinou chloristou. Srážecích neboli čirících činidel je velké množství [2,3]. O detailnějších principech a způsobech aplikace nejčastěji využívaných činidel bude pojednáno v kapitole 2.

Kvalita extrakce je charakterizována tím, jak je separace účinná a také tím, zda nedošlo k poškození integrity jednotlivých frakcí cukrů, aby se zabránilo případným ztrátám. Obecně platí, že účinnost extrakce je silně ovlivněna polaritou použitých rozpouštědel. Extrakce sacharidů z vodného prostředí je složitější úkol vzhledem k tomu, že jsou málo rozpustné v organických rozpouštědlech. Fruktóza a glukóza je přibližně dvakrát tak rozpustnější ve směsi voda/metanol než ve směsi voda/etanol. Sacharóza je dokonce třikrát tak rozpustnější. Celkové množství vyextrahovaného cukru je tedy ovlivněno zvoleným způsobem extrakce. Méně vhodná extrakční činidla a špatně zvolený extrakční postup může mít za následek to, že ve vyextrahovaném vzorku není požadovaný obsah cukrů, jaký byl předpokládán, a to zejména v případě extrakce monosacharidů [2,3].

1.3 Metody stanovení sacharidů

Stanovení sacharidů je možné velkým množstvím metod. Lze je stanovit metodami chemickými (gravimetrická a titrační metoda), fyzikálními (polarimetrie, refraktometrie), také metodami fyzikálně-chemickými (kolorimetrie) a metodami biologickými (kvasné metody) [5,6].

Titrační metody se v potravinářském průmyslu používají pro stanovení redukujících cukrů. Využívá se přitom Bertrandových a Schoorlových metod titrace, kde se stanovení redukujících sacharidů provádí pomocí Fehlingových činidel. Gravimetrie se využívá pro stanovení škrobu, kdy je nejprve nutné převést škrob na rozpustnou formu extrakcí vodou a srážením etanolem. Princip polarimetrie je ve schopnosti sacharidů, jako opticky aktivních látek, stáčet rovinu polarizovaného světla. Refraktometrické stanovení využívá měření indexu lomu stanovované složky. Kolorimetrická metoda je založená na měření redukující síly arsenomolybdenovým činidlem. Společně s biologickými metodami se již moc nepoužívá [5,6,12].

Jednou z nejpoužívanějších moderních metod je chromatografické stanovení sacharidů. Na oddělení mono- a disacharidů se dříve hojně používala chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin Layer Chromatography), nyní je nahrazována vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) [6,13]. Tato moderní metoda analýzy sacharidů bude více popsána v kapitole 3.

2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC

Před vlastním stanovení sacharidů pomocí HPLC je nutné sacharidy vyizolovat ze vzorku. Sacharidy se ve většině případů izolují z potravin pomocí extrakce. Extrakce je jednoduchá separační metoda, která se používá k izolaci sacharidů ze vzorku, ale také k jejich čištění za použití vhodného rozpouštědla. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, volba extrakčního činidla je velmi důležitým krokem k tomu, aby bylo při extrakci dosaženo co nejvyšší účinnosti [2,3].

Po extrakci je nutné ze vzorku odstranit další nežádoucí látky, které by rušily stanovení na kapalinovém chromatografu. Odstranění nežádoucích látek se provádí pomocí čiření. Čiřením se odstraní případný zákal roztoku a nesacharidové složky obsažené v roztoku. Na čiřící roztoky je kladen jeden zásadní požadavek a to, že nesmí sacharidy absorbovat. Ve většině případů se přidávkem čiřícího činidla a následnou filtrací získá čirý roztok. Pokud tomu tak není, je nutné použít další metody, kterými by se čirosti roztoku docílilo. Vhodné je využití extrakce na pevné fázi – SPE (Solid Phase Extraction). Při SPE jsou vzorky filtrovány přes pevný sorbent, který je umístěn ve formě kolonky, a promývány malým množstvím rozpouštědla. Pevný sorbent se volí v závislosti na povaze analyzované látky. Výhodou této techniky je to, že se dá snadno automatizovat, je flexibilní a ekologicky výhodná, vzhledem k použití malého množství rozpouštědla [3,5,14].

2.1 Extrakce vzorku

Princip extrakce tkví v v přechodu analyzované složky, která je v kapalně nebo tuhé fázi, do kapalně fáze rozpouštědla. Nejčastěji používaná rozpouštědla jsou voda a alkoholy nebo jejich směs. Použití vody jako extrakčního činidla je velmi běžné, avšak někdy je před vodou upřednostňováno použití etanolu, případně směsi etanol/voda a to z důvodu potlačení metabolické aktivity enzymů. Potlačení aktivity pomůže zachovat strukturu sacharidů ve vzorku a také se tím dá vyhnout vzájemné interkonverzi cukrů. Nicméně, použití etanolu jako extrakčního činidla, nutně nemusí potlačit veškerou enzymatickou aktivitu. Například aktivita enzymu invertázy není tímto způsobem extrakce nijak výrazně potlačena. Enzymatická aktivita je nejučinněji potlačena vhodnou přípravou vzorku (např. šokové zmrazení, vymrazování). Metoda vymrazování vzorku je založena na podobném principu jako ex-

trakce etanolem, a to na potlačení metabolické aktivity enzymů, způsobující degradaci cukrů během analytického procesu. V této práci je tato metoda experimentálně aplikována [2,3,14].

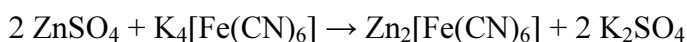
Byla popsána i extrakce sacharidů ředěnými kyselinami. Extrakce ředěnými kyselinami však není vhodná pro analýzu nestrukturních sacharidů, tedy cukrů. Při extrakci stejného vzorku vodou a 0,5 M H₂SO₄ bylo prokázáno, že kyselina podstatně narušila integritu cukrů [2,3].

2.2 Čiření vzorku

Čiřících činidel existuje velké množství. Obecný princip čiření je vysrážet z roztoku nežádoucí látky. Čiřící činidlo, které by vyhovovalo všemi svými vlastnostmi všem stanovovaným látkám, neexistuje. Buď je problém v tom, že má malý čiřící efekt, nebo naopak velký čiřící efekt, avšak částečně absorbuje i stanovované cukry [3,14].

2.2.1 Čiření podle Carreze

Při použití Carrezových činidel se ve vyextrahovaném cukerném roztoku vytvoří sraženina hexakynoželeznanu zinečnatého. K čiření se používá 30% síran zinečnatý – Carrez I a 15% hexakynoželeznan tetradraselný – Carrez II. Vysoká účinnost použitím těchto činidel je hlavně v kyselém nebo neutrálním prostředí. U zásaditých roztoků je nutné jejich okyselení zředěnou kyselinou octovou. Carrezova činidla účinně sráží bílkoviny v roztoku. Podstatou vytvoření sraženiny hexakynoželeznanu zinečnatého je následující reakce: [5,14,15]



2.2.2 Čiření neutrálním octanem olovnatým

Používá se 35% neutrální roztok oxidu olovnatého v kyselině octové. Octan se přidává do analyzovaného roztoku do té doby, dokud se tvoří sraženina. V některých případech zůstane roztok zakalený, což je způsobeno přítomností uhličitanu olovnatého. Zákal se odstraní 10% hydrogenfosforečnanem sodným. Jeho použití je vhodné pro čiření neutrálních roztoků a nepříliš se hodí pro čiření roztoků kyselých. Neutrální octan olovnatý odstraňuje op-

ticky aktivní organické kyseliny, ale odstranění bílkovin je v tomto případě nedokonalé [5,14,15].

2.2.3 Čiření zásaditým octanem olovnatým

Použité množství zásaditého roztoku octanu olovnatého, což je roztok oxidu olovnatého s octanem olovnatým, se liší podle povahy analyzovaného vzorku. Nejvíce se toto čiření využívá v cukrovarnictví. Zásaditý octan olovnatý sráží z neutrálních nebo slabě alkalických šťáv jak všechny opticky aktivní organické kyseliny, tak i bílkoviny. Účinnost čiření se snižuje v kyselém prostředí [5,14,15].

2.2.4 Čiření podle Herlese

Čiření podle Herlese je principiálně založeno na vlastnostech zásaditého dusičnanu olovnatého, který vzniká smísením dusičnanu olovnatého a hydroxidu sodného. Pro co největší účinnost čiření je vhodné přidat k analyzovanému vzorku nejprve dusičnan olovnatý, dobře promíchat a až poté přidat stejný podíl hydroxidu sodného. Čiření je vhodné pro slabě kyselé, neutrální nebo slabě zásadité roztoky. Silně zásadité roztoky se okyselují zředěnou kyselinou octovou [5,14,15].

2.2.5 Čiření kyselinou fosfowolframovou

K čiření se používá 5% kyselina fosfowolframová. Množství, které se k čiření použije, závisí na obsahu nečistot. V kyselém prostředí sráží kyselina fosfowolframová bílkoviny [5,14,15].

2.2.6 Ostatní čiřící činidla

Při analýze cukrů v mléce je možné použít kombinaci Carrezových čiřících činidel spolu s 20% acetonitrilem. Acetonitril způsobí snadnější srážení bílkovin, čímž se docílí větší čirosti filtrátu. Čiření se také provádí použitím kyseliny wolframové, kyseliny trichloroctové nebo hydroxidem hlinitým. Pokud vzorek obsahuje anorganické soli nebo aminokyseliny, je možné použití ionexů jako čiřících činidel. Možné je také použití aktivního uhlí. Problém však nastává v tom, že aktivní uhlí částečně absorbuje cukry [4,14].

3 STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC-RI

Chromatografie je separační metoda, která je založena na rozdílné separaci jednotlivých složek směsi mezi dvěma nemísitelnými fázemi a to fází mobilní (pohyblivou) a fází stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární fází je buď kapalina, nebo pevná látka. Stacionární fáze je ukotvena na pevném nosiči v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze touto kolonou protéká [16,17].

3.1 Princip HPLC

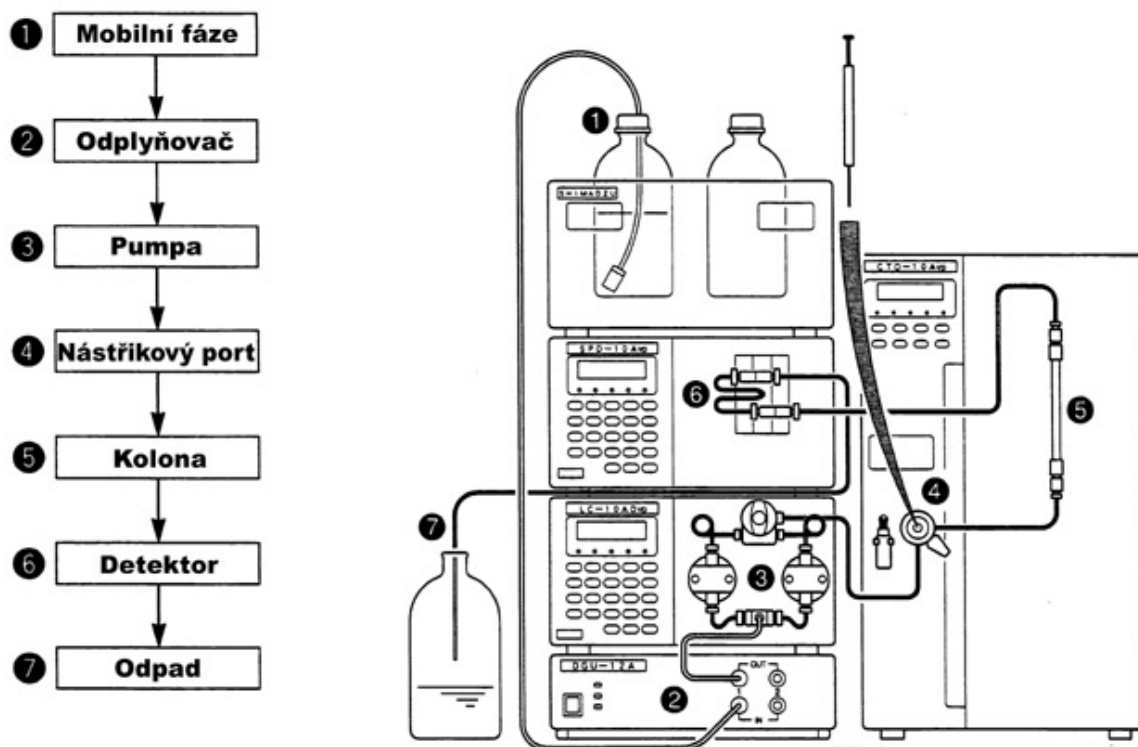
Mobilní fáze je u vysokoúčinné kapalinové chromatografie poháněna za pomoci čerpadla a vysokého tlaku. Mobilní fáze, která proteče kolonou a vystupuje z ní, je dále vedena do detektoru. Detektor na základě změny fyzikálně-chemické veličiny zaznamenává přítomnost separovaných složek. Grafická odezva signálu detektoru na čase je ve formě chromatogramu. Každé vyseparované složce odpovídá jeden pík. Podle charakteru píku a srovnání chromatogramů standardů lze určit, o jakou látku se jedná. Separace a eluce jednotlivých složek je silně ovlivněna jak vlastnosti fáze mobilní, tak vlastnostmi fáze stacionární. Eluce se provádí buď s konstantním složením mobilní fáze při použití izokratické eluce, nebo se při gradientové eluci složení mobilní fáze programově mění. Izokratická eluce se více hodí pro látky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a naproti tomu gradientová eluce je výhodnější pro látky s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi [16,18,19].

Základní cíl chromatografie je dosáhnout co nejefektivnějšího rozdělení jednotlivých složek za co nejkratší časový horizont. HPLC metoda je vhodná pro analýzu látek polárních, netěkavých a tepelně labilních. Kvalita separace je úměrná rozdílu v separaci jednotlivých složek a účinnosti kolony. Účinnost kolony je charakteristická tím, jak moc se rozšiřují zóny separovaných látek na koloně [16,17].

3.1.1 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf obsahuje zásobníky mobilní fáze s čerpadlem, dávkovače vzorků (autosampler, manuální dávkovací ventil), separátor látek (chromatografická kolona, termostat kolony), detektor a počítač s příslušným softwarem (schéma viz Obrázek č. 1). Zásobníky mobilní fáze jsou opatřeny zátkou, krou prochází dávkovací hadice. Mobilní fáze je čerpána přes filtry. Existuje spousta druhů kapalinových chromatografů s různými ob-

měnami, kde některé komponenty chybí a jiné jsou naopak přidány. Obecně musí být kapalinový chromatograf konstruován tak, aby byl vliv mrtvých objemů, tj. retenční objemu analytu, který není v koloně zadržován, omezen na minimum [16,20].



Obrázek č. 1 Schéma kapalinového chromatografu SHIMADZU LC-10AD [21]

3.1.2 Dávkovací zařízení HPLC

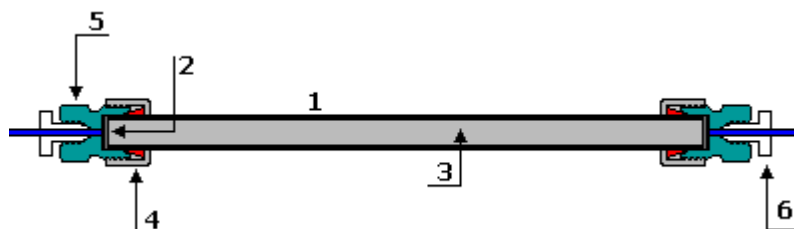
Dávkování vzorku je pro celý proces stanovení analyzované látky velmi důležité, pokud totiž dávkování nebude dokonalé, může se to projevit na rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. Dříve se používalo dávkování vzorku formou injekční stříkačky. Dnes se již tato metoda dávkování vzorku využívá méně a je nahrazena využíváním manuálních smyčkových dávkovačů nebo automatických dávkovačů (tzv. autosamplerů). Autosamplery jsou výhodné hlavně kvůli požadavku automatizace dávkovacího procesu, což je pro laboratoře, které zpracovávají velké množství vzorků, výhodné [16,22].

3.1.3 Kolony pro HPLC

Kolony pro HPLC jsou dnes vyráběny komerčním způsobem. Uživatel tedy nemůže příliš ovlivnit způsob jejich konstrukce, může si pouze vybrat mezi různými druhy sorbentů a velikostí částic v náplni [16,20].

Vnější povrch pláště chromatografické kolony se většinou vyrábí z nerezové ocele, plastu nebo skla. Nerezová ocel je antikorozivní, avšak při použití některých organických rozpouštědel nebo mobilních fází s chloridy, je ocel málo odolná. Na materiál, který tvoří vnitřní povrch kolony, jsou kladeny určité nároky. Materiál musí být odolný jak vůči vysokým tlakům, tak i vůči chemickému působení mobilní fáze. Pokud je to možné, měl by být vnitřní materiál kolony hladký [16,20].

Kolona (viz Obrázek č. 2) je složena z kovového pláště (1), uzavřeného kovovou fritou (2), ve kterém je uložena stacionární fáze (3). Frita zabraňuje uvolňování stacionární fáze a současně umožňuje průchod fáze mobilní. Kolony jsou na obou koncích uzavřeny ochranným kroužkem (4) s kovovou hlavicí (5), kterou prochází kapilára se šroubem [16].



Obrázek č. 2 Schéma chromatografické kolony [16]

Pro analytické účely jsou využívány chromatografické kolony o vnitřních průměrech 2,1 – 5 mm, délce 10 – 300 mm s náplní o velikosti částic 1 – 10 μm [16].

Materiály, které se používají pro plnění kolony, jsou ve velké většině složeny ze silikagelu nebo z podobné anorganické látky, na níž je navázána stacionární fáze. Separace sacharidů je na běžných stacionárních fázích nedokonalá. Proto se pro stanovení sacharidů pomocí HPLC používají kolony na bázi sulfonované divinylbenzonové pryskyřice a silikagelu. Také je možné použití polymeru, případně oxidu zirkoničitého nebo křemene, jako sorbentu [23,24].

3.1.4 Detektory pro HPLC

Detektory pro HPLC se dělí na destruktivní a nedestruktivní. U destruktivních detektorů dochází k nevratným změnám detekované složky a u nedestruktivních detektorů k těmto změnám nedochází. Možné je i jiné dělení detektorů, a to na koncentrační a hmotnostní. Detektory lze obecně rozdělit do čtyř základních skupin, které odpovídají jejich vlastnostem. První skupinou jsou detektory s univerzálními vlastnostmi (refraktometrický detektor a CAD – Charged Aerosol Detector). Druhou skupinou jsou detektory, detekující specifické vlastnosti vzorku (detektor fluorescenční, detektor spektrofotometrický). Třetí skupina zahrnuje detektory, které detekují změny mobilní fáze (detektory hmotnostně-spektrometrické, ELSD – Evaporative Light Scattering Detector). Poslední skupinou detektorů jsou spojené techniky, kdy je k HPLC detekci připojena jiná analytická metoda HPLC (detektory hmotnostně-spektrometrické, detektory NMR – Nuclear Magnetic Resonance) [16,22]. Detailnější popis refraktometrické detekce, která byla v práci použita, je uveden v kapitole 3.1.4.1.

3.1.4.1 Princip refraktometrické detekce HPLC

Refraktometrická detekce – RID (Refractive Index Detection) je detekce, která je nejvyužívanější při stanovování sacharidů. Princip RI detekce je v měření indexu lomu mobilní fáze vyvolaného rozpuštěnou látkou a indexem lomu čisté mobilní fáze. Odezva RI detekce je na základě rozdílu indexu lomu mobilní fáze v měrné a referenční cele. Detektor je tedy tím citlivější, čím větší je rozdíl indexu lomu. RI detektor je univerzální a tak může být použit pro stanovení různých druhů látek. Nevýhoda tohoto detektoru je v jeho nižší citlivosti oproti jiným detektorům, využívaných pro kapalinovou chromatografii. Při použití RI detektoru také není možné použití eluce s gradientem pro mobilní fázi, a to kvůli velkým změnám indexu lomu. Důležité je i dodržování konstantní teploty během měření, jinak by také docházelo k velkým změnám indexu lomu, vzhledem k jeho citlivosti na teplotu. Použití gradientové eluce při HPLC-RI není v praxi možné, a to z důvodu složitější konstrukce celého detektoru. Konstrukce se liší kvůli tomu, aby mohlo být stejně měněno složení mobilní fáze jak v měrné, tak i v referenční cele během celé gradientové eluce [16,26,27].

Podle typu konstrukce se refraktometrické detektory dělí dva typy – deflexní (výchylkový) a reflexní (Fresnelův) [16].

Princip deflexního detektoru je v tom, že se paprsek, který vychází ze zdroje záření, odrazí na polopropustném zrcadle směrem k měřicí cele a postupně projde měrnou a referenční celou. Po průchodu celami se odrazí a vrací se zpět. Poté, kdy prochází polopropustným zrcadlem, dopadá paprsek na planparalelní destičku a na hranu zrcadlového hranolu. Odtud se odrazí na fotoelektrické čidla. Změna indexu lomu v měrné cele je zaznamenávána vychylkami paprsku dopadajícího na zrcadlový hranol. Na fotoelektrické čidlo poté dopadá odlišný světelný tok. Rozdíl světelných toků je převeden na elektrický signál. Citlivost detekce je tím větší, čím je větší rozdíl mezi indexem lomu mobilní fáze s rozpuštěnou látkou a indexem lomu čisté mobilní fáze [16,22].

Reflexní detektor principiálně vychází z Fresnelova zákona odrazu světla. Detektor měří v měrné a referenční cele intenzitu světla odraženého z fázového rozhraní mezi kapalinou a sklem. Z měrné a referenční cely dopadá světlo na fotoelektrické čidla. Rozdíl v toku záření, které dopadá na fotoelektrické čidla je mírou koncentrace stanovovaných složek [16,22].

4 STANOVENÍ CUKRŮ V RŮZNÝCH POTRAVINÁCH POMOCÍ HPLC-RI

Stanovení sacharidů v potravinách je velmi důležité. Informace o sacharidovém složení a koncentraci sacharidů v potravině je nutné znát i z důvodu technologie výroby. Při analýze medu znamená zvýšená koncentrace sacharózy to, že včely byly krmeny cukrem. Přebytek stejného disacharidu ve srovnání s normami pro výrobu šťáv a hroznového vína je důkazem porušení technologie výroby. Složení a koncentrace cukrů ve výrobcích pro děti je důležitým indikátorem kvality. Koncentrace cukrů musí odpovídat hygienickým předpisům a normám [28].

Stanovit cukry v potravinách pomocí HPLC-RI je možné různými metodami. Metody se liší podle charakteru analyzovaného vzorku. Například cukry s menším množstvím hydroxylových skupin eluují dříve než ty, které hydroxylových skupin obsahují více [4]. V následujících kapitolách jsou uvedeny příklady konkrétních aplikací, které byly použity u různých typů potravin, v článcích dostupných z databáze WOS.

4.1.1 Mléko

Požadované množství vzorku mléka se extrahuje malým množstvím vody. Poté je vzorek inkubován při 60 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci je provedeno nejprve srážení Carrezovými čiřícími činidly a poté ještě acetonitrilem. Filtrát se promíchá a nechá se stát 1 hodinu v klidu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby se filtrát centrifuguje a filtruje přes nylonovou membránu. Kalibrační standardy cukrů a filtrát se podrobí působení ultrazvuku a to z důvodu odstranění rozpuštěných plynů z roztoku. Detekce je prováděna na HPLC-RI s kolonou Phenomenex Luna NH₂. Použitá mobilní fáze je acetonitril/voda v poměru 70:30, při izokratické eluci s průtokem 1 ml.min⁻¹ [4].

U tepelně ošetřeného mléka je stanovení laktózy komplikovanější. V mléce je vedle laktózy přítomná i laktulóza. Laktulóza vzniká izomerací laktózy za vysokých teplot. Laktulóza se tedy přirozeně nevyskytuje v syrovém ani v pasterovaném mléce. Detekovaná byla například v mléce ošetřeném UHT (Ultra High Temperature) záhřevem. Vzorek tepelně ošetřeného mléka se extrahuje teplou vodou (40 °C). Po extrakci se vysráží Carrezovými činidly, nechá se 20 minut stát a poté se filtruje. Oba disacharidy mají při HPLC stanovení přibližně stejný retenční čas (pík laktulózy je před píkem laktózy), množství laktózy ve vzor-

ku je asi o dva řády vyšší než množství laktulózy. Vzhledem ke skutečnosti obtížného stanovení samostatných disacharidů byla navržena optimalizace metody. Při HPLC separaci byly použity různé druhy kolon. Při použití kolony Ultra Amino a také kolony Sugar Pak I měla laktulóza a laktóza přibližně stejný retenční čas. Při použití kolony Pinnacle II Amino se retenční čas lišil skoro o minutu, kvalita separace ještě pořád nebyla optimální. Řešením bylo použití dvou kolon Pinnacle II Amino zapojených do série, udržovaných při teplotě 35 °C za použití mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 75:25. Retenční čas laktulózy a laktózy se lišil více než o minutu, čímž se dosáhlo vysoké účinnosti separace [29,30].

4.1.2 Mléčné výrobky

V mléčných výrobcích se stanovuje přítomnost glukózaminů a laktózy. Vzorek se extrahuje vodou a zhomogenizuje se. Čiření je prováděno použitím 20% octanu olovnatého spolu s 1,5% šťavelanem sodným a 3,5% hydrogenfosfátem. Poté se nechá vzorek 30 minut v klidu. Nakonec se vzorek zfiltruje přes nylonový filtr. Separace je realizovaná na HPLC-RI s kolonou Shodex Asahipak NH₂P-50. Použitá mobilní fáze je acetonitril/voda v poměru 70:30, při izokratické eluci s průtokem 1 ml.min⁻¹ při teplotě separace 35°C [31].

U sýrů je stanovení odlišné. Sýry neobsahují tak velké množství laktózy jako některé mléčné výrobky. Vzorek sýru se extrahuje teplou vodou (50 °C). Po dosažení požadované teploty je roztok 15 minut zahříván za mírného míchání. Poté se z roztoku injekční stříkačkou odebere alikvotní množství vzorku. Vzorek se přefiltruje přes nylonový filtr. Jak je zřejmé, při stanovení touto metodou není potřeba využívat čistícího kroku v podobě čiření čiřícími činidly. Separace je pomocí HPLC-RI s kolonou Waters Sugar-Pak 1, která se zahřívá na 90 °C. Jako mobilní fáze je použita voda s průtokem 1 ml.min⁻¹ [32].

4.1.3 Cukrovinky

Sušenky a různé druhy cukrovinek je možné stanovit rychlou metodou bez předběžné hydrolýzy. Vzorek je nejprve nutné zhomogenizovat, což v případě tuhých vzorků zahrnuje především rozdrčení vzorku. Požadované množství rozdrčeného vzorku se zředí vodou a míchá se na magnetickém míchadle při 50 – 55 °C po dobu asi 5 minut. Vzorek se poté ještě zředí vodou a centrifuguje se. Supernatant se po centrifugaci oddělí od sraženiny a následuje čištění na SPE. K supernatantu se přidá malé množství (5 % objemu supernatantu) izopropanolu. Vzniklý roztok se promývá kolonou na SPE. SPE odstraní další nečistoty,

a to hlavně potravinářské barviva a tříslloviny. Limity pro stanovení v tuhých vzorcích jsou $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ glukózy a fruktózy a $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ laktózy, maltózy a mannózy. Detekce je na HPLC-RI s kolonou Agilent Zorbax s aminopropyllovou stacionární fází chráněnou odpovídající předkolonou. Použitá mobilní fáze je acetonitril/voda v poměru 82:18, s průtokem 2 ml.min^{-1} . Tato metoda je vhodná i pro stanovení cukrů v medu, nebo i mléčných výrobků [28].

4.1.4 Ovocné nápoje

Ovocné nápoje se stanovují stejně jako cukrovinky, ale je nutné je zbavit rozpuštěných plynů obsažených ve vzorku povařením. Limity pro stanovení v kapalných vzorcích jsou $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ glukózy a fruktózy a 1 g.l^{-1} laktózy, maltózy a mannózy. Metoda je vhodná jak pro stanovení cukrů v ovocných nealkoholických nápojích, tak i pro stanovení cukrů ve víně [28].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem bakalářské práce bylo stanovení sacharidů ve vybraných potravinách pomocí HPLC-RI. Před vlastním stanovením bylo nutné optimalizovat proces přípravy vzorku u různých typů potravin – zejména proces extrakce a čiření.

6 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY

6.1 Chemikálie

Na vyčiření vzorků byly použity:

- síran zinečnatý pro přípravu Carrezova činidla I (Penta)
- hexakynoželeznan draselný pro přípravu Carrezova činidla II (Penta)
- acetonitril (Sigma Aldrich)
- zásaditý octan olovnatý (Penta)
- kyselina trichloroctová (Ing. Petr Lukeš).

Kalibrační křivky byly připraveny ze standardů glukózy, fruktózy, laktózy, maltózy a sacharózy (Sigma Aldrich).

Pro vlastní stanovení pomocí HLPC-RI byly použity:

- ultra čistá voda (přečištěná systémem Aqua MaxTM Ultra 370 Series; Young Lin)
- acetonitril pro HPLC (Sigma Aldrich).

6.2 Pomůcky a přístroje

Vlastní stanovení cukrů proběhlo na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-20AD Prominence, který se skládal z následujících součástí:

- kvartérní pumpa
- pětikanálový degaser DGU-20A_{5R}
- autosampler SIL-20A_{CHT}
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (vše Shimadzu)
- kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μm)
- předkolonový cartridge filtr 0,2 μm (Optimize Technologies)

Při přípravě vzorku byly použity:

- analytické váhy GR-200-EC (A&D Instruments)
- magnetické míchadlo s ohřevem Wise Stirr MSH-20D (Wisd Laboratory Instruments)

- vortex V-1 plus (Biosan)
- zařízení pro extrakci na pevné fázi
- SPE kolonky s náplní z kopolymeru styrenu a divinylbenzenu (Strata SDB-L, Phenomenex)
- filtrační papír KA 4 (Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský)
- stříkačkové filtry 0,22 μm (Cronus)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

6.3 Analyzované vzorky

K analýze cukrů bylo použito několik druhů potravin. Analyzovány byly jak výrobky tekuté, tak i výrobky tuhé a polotuhé. Tekuté výrobky zahrnovaly sirupy, ovocné šťávy a nápoje (Tabulka č. 1) a také energetické a ostatní nápoje (Tabulka č. 2). Polotuhé výrobky byly různorodého charakteru (Tabulka č. 3), stejně jako výrobky tuhé (Tabulka č. 4). Přehled použitých druhů potravin, množství a druhy cukrů uvedených na obalu, je uveden v následujících tabulkách.

Tabulka č. 1 Tekuté výrobky (sirupy, ovocné šťávy a nápoje)

| Vzorek | Výrobce | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Druhy cukrů uvedené na obalu |
|---------------------------------|--------------|---|--|
| Sirup malina | Relax | 67,9 | Glukózo-fruktózový sirup, sacharóza |
| Sirup lesní ovoce | Relax | 67,2 | Glukózo-fruktózový sirup, sacharóza |
| Sirup pomeranč | Dizzy | 77,1 | Sacharóza |
| Sirup aloe vera | Jupí | 71,0 | Glukózo-fruktózový sirup, sacharóza |
| Agávový sirup | Country Life | 65,0 | Fruktóza |
| Orange juice | Dizzy | 9,0 | Bez přidané sacharózy |
| Apple juice | Dizzy | 10,0 | Bez přidané sacharózy |
| Pomeranč džus | Granini | 8,8 | Bez přidané sacharózy |
| Mošt | Bohemia | 10,2 | Bez přidané sacharózy |
| Ovocný nápoj pomeranč | Relax | 11,0 | Bez přidané sacharózy |
| Ovocný nápoj jablko, arónie | Relax | 11,0 | Bez přidané sacharózy |
| Ovocný nápoj jablko, broskev | Relax | 11,0 | Bez přidané sacharózy |

Tabulka č. 2 Tekuté výrobky (energetické a ostatní nápoje)

| Vzorek | Výrobce | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Druhy cukrů uvedené na obalu |
|--------------------------|---------------------|---|---------------------------------|
| Black energy | Food care | 10,3 | Sacharóza |
| Red bull | Red bull | 11,0 | Sacharóza a glukóza |
| Pure-bio energy drink | Cols | 12,0 | Sacharóza |
| Hot apple | W. T. Lynch Food | 11,0 | Sacharóza, glukóza |
| Actimel | Danone | 10,5 | Sacharóza, glukóza |

Tabulka č. 3 Polotuhé výrobky

| Vzorek | Výrobce | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Druhy cukrů uvedené na obalu |
|--|------------|---|---|
| Sunárek meruň- ka | Hero | 10,3 | Bez přidané sacharózy |
| Cvrček kojeneč- ká výživa bro- skv | Hamé | 15,5 | Sacharóza, fruktóza, glukó- za, maltodextrin |
| Med | Jan Kolomý | – | – |
| Plnotučná hořči- ce | Alba | 5,5 | Sacharóza |
| Jemný kečup Gurmán | Otma | 31,2 | Sacharóza, škrobový sirup |

Tabulka č. 4 Tuhé výrobky

| Vzorek | Výrobce | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Druhy cukrů uvedené na obalu |
|------------------------|---------|---|---------------------------------|
| Granko | Orion | 74,0 | Sacharóza |
| Vitaminové tablety | Vitar | – | – |
| Direct energy dextrose | Lidl | 77,8 | Glukóza |
| Chipsy paprika | Bohemia | 2,0 | Sacharóza |
| Krekry graham | Tuty | 6,7 | Invertní sirup |

6.4 Optimalizace přípravy vzorků

Optimalizace vzorků byla proveden zvlášť pro tekuté (modelový vzorek – ovocná šťáva Dizzy orange juice), polotuhé (modelový vzorek – Alba plnotučná hořčice) a tuhé vzorky (modelový vzorek – Tuty kreky graham).

U tekutých vzorků nebylo nutné optimalizovat extrakční krok, bylo optimalizováno pouze čiření vzorků. Použita byla čtyři různá čiřící činidla (Carrezova činidla, kyselina trichloroctová, acetonitril a zásaditý octan olovnatý) a jejich kombinace, ale také kombinace jednotlivých čiřidel a vymrazování. Při čiření Carrezovými činidly bylo do vzorku přidáno nejprve 2,5 ml Carreze I, vzorek byl minutu promícháván a poté nechán minutu v klidu, a následně 2,5 ml Carreze II. Po přidání Carreze II byl vzorek opět minutu promícháván a pak byl nechán 5 minut v klidu. Stejný postup čiření byl vyzkoušen i s ostatními čiřidly, kdy bylo pro vyčiření do vzorku přidáno 5 ml kyseliny trichloroctové nebo acetonitrilu nebo zásaditého octanu olovnatého. Kombinace čiřidel vycházela z faktu, že Carrezovy roztoky jsou pro čiření obecně nejefektivnější. Proto byla zvolena kombinaci právě Carrezových činidel spolu s ostatními čiřidly. Postup čiření byl stejný jako při použití jednotlivých čiřidel s rozdílem, že nejprve se do vzorku přidal Carrez I (1,5 ml) poté Carrez II (1,5 ml) a následně 2 ml kyseliny trichloroctové nebo acetonitrilu nebo zásaditého octanu olovnatého. Vyzkoušeno bylo i použití jednotlivých čiřidel spolu s vymrazováním. Čiření proběhlo naprosto stejným způsobem, jako při čiření jednotlivými činidly. Po vyčiření byl vzorek

vymrazován. Vymrazování bylo uskutečněno vložením vyčiřené vzorku do ledové tříště, kde byl vzorek ponechán 15 minut v klidu [4,30].

U polotuhých a tuhých vzorků byla kromě optimalizace čiření uskutečněna i optimalizace extrakce cukrů ze vzorku. Použity byly dvě různé teploty extrakce – 25 °C a 50 °C. Délka extrakce byla zvolena na 15 minut. Extrakce byla provedena na magnetickém míchadle (v případě 50 °C na vyhřívaném magnetickém míchadle), kde byla teplota průběžně kontrolována vpichovým teploměrem [4,30,32]. Proces čiření byl optimalizován podle postupu uvedeného u tekutých vzorků.

Kromě výše uvedených optimalizací byla také aplikována extrakce na pevné fázi (SPE) a to u barevných vzorků. Barviva přítomná v potravinách kontaminují chromatografickou kolonu a snižují tak její účinnost. Při optimalizaci bylo potřeba ověřit, zda se v SPE koloně zachycují pouze barviva a nedochází ke ztrátám analyzovaných cukrů. Vzhledem k tomu, že jsou barviva většinou aromatické sloučeniny, byly použity SPE kolony s náplní z kopolymeru styrenu a divinylbenzenu. Potvrzení absence ztrát při čištění vzorku pomocí SPE bylo provedeno tak, že byly připraveny roztoky standardů o známé koncentraci, které byly analyzovány po použití SPE [28].

6.5 Příprava vzorků

Příprava tekutých vzorků začala navážením potřebného množství výrobku. Následovalo čiření Carrezovými činidly. Detailnější popis čiření je uveden v kapitole 6.4. Po vyčiření byl vzorek zfiltrován přes papírový filtr KA 4. Před vlastním stanovením byly vzorky ještě jednou zfiltrovány přes stříkačkové filtry a po případném zředění byly zhomogenizovány na vortexu. U polotuhých a tuhých výrobků byl princip přípravy odlišný. Bylo nutné vzorek zhomogenizovat a extrahovat ve vodě při 50 °C na magnetickém míchadle po dobu 15 minut. Poté se již princip čiření a filtrace nijak nelišil od přípravy tekutých vzorků [28]. Každý vzorek byl takto připraven dvakrát.

6.6 Analýza cukrů pomocí HPLC-RI

Sacharidy byly stanoveny na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-20AD Prominence s refraktometrickou detekcí. Použitá mobilní fáze byla acetonitril/voda v poměru 80:20. analyzované vzorky byly eluovány izokratickou elucí s průtokem mobilní fáze

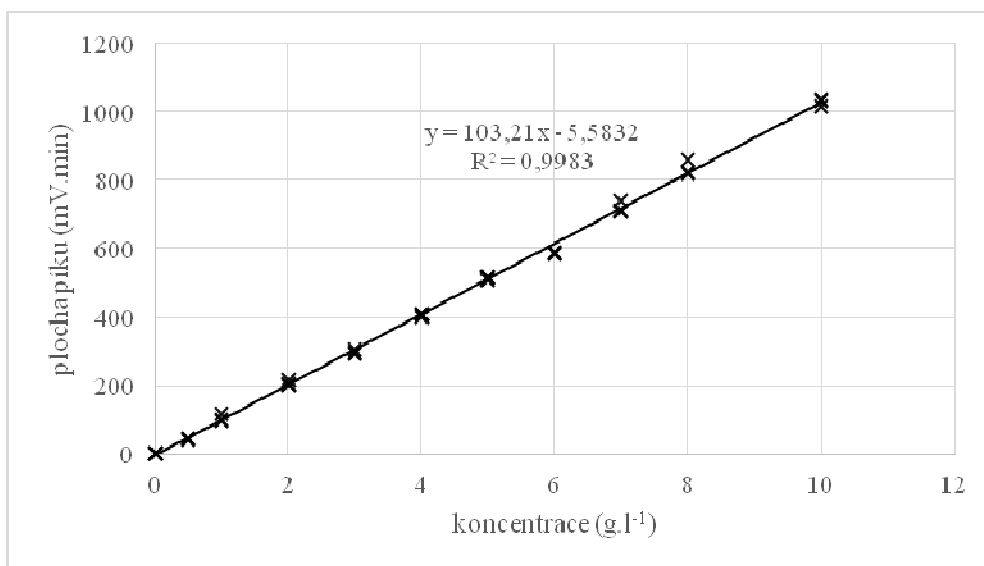
1,6 ml.min⁻¹. Délka analýzy byla 30 minut. Každý připravený vzorek byl analyzován dvakrát (n = 4) [28].

Před vlastním stanovením byly přichystány kalibrační řady všech stanovovaných sacharidů. Kalibrační řady fruktózy, glukózy, sacharózy, maltózy a laktózy byly připraveny ze zásobních roztoků standardů o koncentraci 100 g.l⁻¹. Pro všechny standardy byly připraveny koncentrace v rozmezí 0,5 – 10 g.l⁻¹. Z kalibračních řad byly sestrojeny kalibrační křivky, z jejichž z regresních rovnic byl vypočítán obsah sacharidů v g.100 ml⁻¹ nebo g.100 g⁻¹.

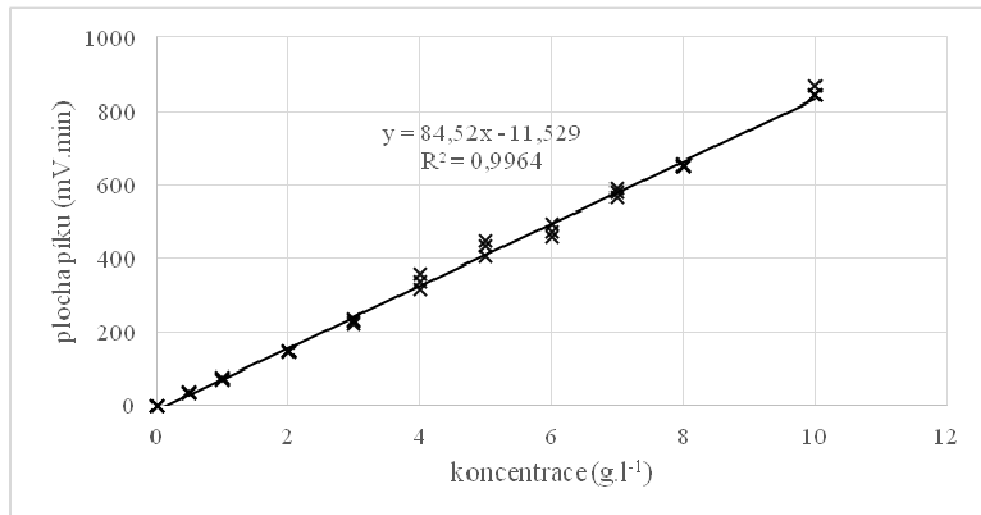
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Kalibrační křivky

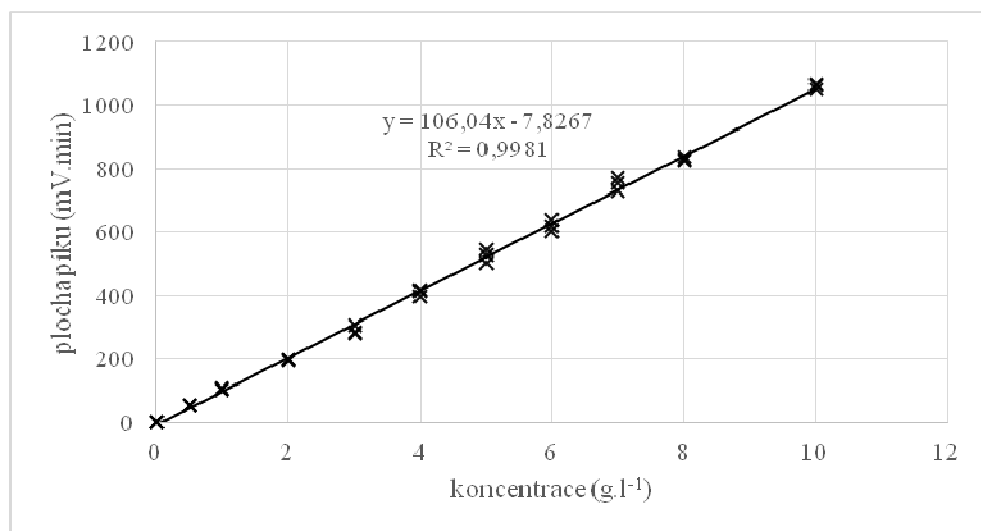
Byly sestrojeny kalibrační křivky jednotlivých standardů (Obrázek č. 3 – 7) v rozmezí koncentrace 0,5 – 10 g.l⁻¹ (0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 a 10 g.l⁻¹). Mez stanovitelnosti (LOQ) metody byla shodná s nejnižší koncentrací kalibrační řady, tj. 0,5 g.l⁻¹. V tomto koncentračním rozmezí byla závislost plochy píku na koncentraci cukrů lineární (korelační koeficienty min. 0,995). Z regresních rovnic byly vypočítány obsahy jednotlivých cukrů v g.100ml⁻¹ u tekutých vzorků a g.100g⁻¹ u tuhých a polotuhých vzorků. Na obrázku č. 8 je zobrazen chromatogram směšného standardu cukrů o koncentraci 10 g.l⁻¹.



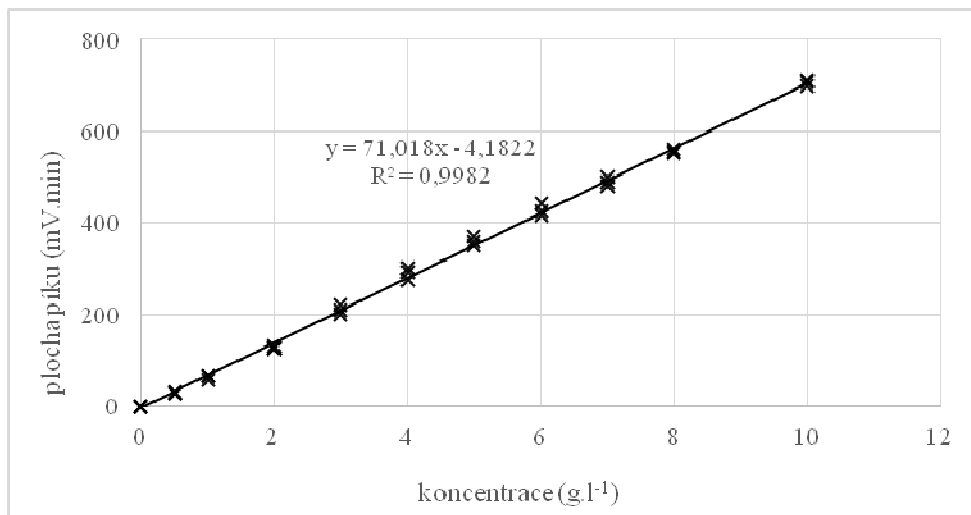
Obrázek č. 3 Kalibrační křivka fruktózy



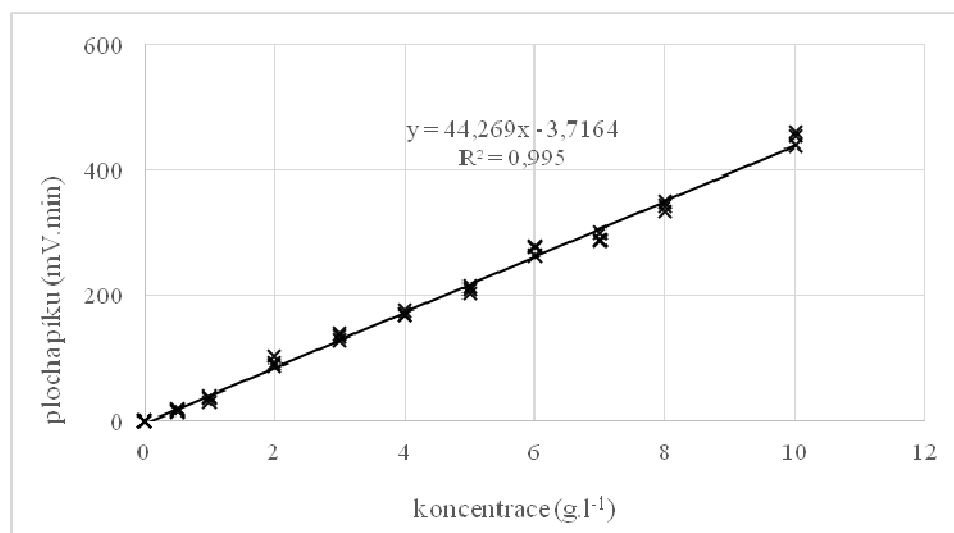
Obrázek č. 4 Kalibrační křivka glukózy



Obrázek č. 5 Kalibrační křivka sacharózy



Obrázek č. 6 Kalibrační křivka maltózy



Obrázek č. 7 Kalibrační křivka laktózy

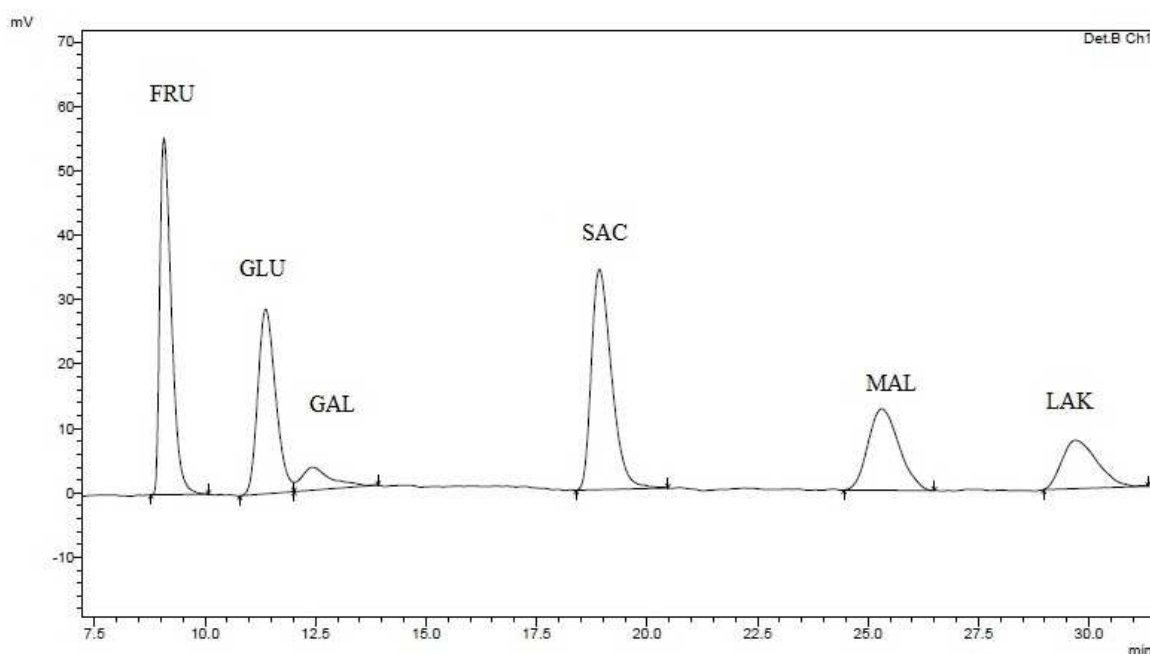
7.2 Výsledky optimalizace přípravy vzorků

7.2.1 Extrakce na pevné fázi

Barevné vzorky byly podrobeny SPE, aby byla odstraněna barviva, která snižují účinnost chromatografické kolony [28]. Z výsledků (Tabulka č. 5) je patrné, že po průchodu vzorku SPE kolonkou nedošlo ke ztrátám cukrů a bylo tedy možné tento krok zařadit do přípravy barevných vzorků.

Tabulka č. 5 Výsledky stanovení cukrů v roztocích standardů po extrakci na pevné fázi

| Koncentrace standardu (g.l ⁻¹) | Analyzované množství cukrů (g.l ⁻¹) | | | | |
|--|---|---------|-----------|---------|---------|
| | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | Maltóza | Laktóza |
| 0,5 | 0,48 | 0,51 | 0,45 | 0,50 | 0,53 |
| 1,0 | 1,03 | 0,98 | 0,96 | 1,05 | 1,00 |
| 3,0 | 3,00 | 3,03 | 2,97 | 3,06 | 2,96 |
| 5,0 | 5,06 | 5,05 | 4,94 | 4,98 | 5,02 |
| 7,0 | 6,94 | 7,01 | 6,96 | 7,04 | 7,02 |
| 10,0 | 9,93 | 10,00 | 10,05 | 10,03 | 9,96 |

Obrázek č. 8 Chromatogram směsného standardu cukrů o koncentraci 10 g.l⁻¹

7.2.2 Optimalizace přípravy tekutých vzorků

Pro optimalizaci čiření u tekutých výrobků byla vybrána ovocná šťáva Dizzy orange juice, u které výrobce na obalu uvádí celkový obsah cukrů 9 g.100ml⁻¹. Z výsledků (Tabulka č. 6) je patrné, že nejvyšší obsahy všech tří cukrů (zároveň nejvíce se blížíci údajům na obalu výrobku) byly stanoveny za použití samotných Carrezových činidel, které tedy byly dále využívány u ostatních vzorků. Při použití ostatních čiridel došlo k většímu či menšímu podhodnocení obsahu cukrů. Za nejméně efektivní lze pokládat čiření za použití acetonitrilu, kde je množství detekovaných cukrů výrazně nižší než u čiření Carrezovými činidly. Co se týká použití kombinací Carrezových činidel s ostatními čiridly, tak za nejefektivnější se dá

stanovit čiření spolu s kyselinou trichloroctovou, kde jsou výsledky obsahu stanovených sacharidů jen mírně odlišné od použití samostatných Carrezových činidel. Nejméně efektivní je opět použití acetonitrilu v kombinaci s Carrezovými činidly. Obecně bylo efektivnější použití Carrezových činidel v kombinaci s ostatními činidly, než samostatné použití ostatních činidel. Kombinace čiření a vymrazování poskytla srovnatelné, nebo jen nevýznamně nižší výsledky ve srovnání s použitím samotných čiridel. S ohledem na podstatné prodloužení přípravy vzorků v případě využití vymrazování nebyl tento krok dále aplikován.

Tabulka č. 6 Výsledky optimalizace čiření tekutých vzorků

| | Použité čiridlo | Množství stanovených cukrů (g.100 ml ⁻¹) | | |
|--|-----------------|--|-------------|-------------|
| | | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza |
| Jednotlivá čiridla | CČ | 3,21 ± 0,12 | 2,54 ± 0,11 | 2,93 ± 0,10 |
| | TCA | 3,09 ± 0,10 | 2,42 ± 0,10 | 2,80 ± 0,07 |
| | ACN | 2,57 ± 0,08 | 2,11 ± 0,04 | 2,45 ± 0,11 |
| | OO | 2,95 ± 0,09 | 2,26 ± 0,05 | 2,69 ± 0,06 |
| Kombinace čiridel | CČ–TCA | 3,18 ± 0,11 | 2,48 ± 0,12 | 2,87 ± 0,10 |
| | CČ–ACN | 3,08 ± 0,10 | 2,34 ± 0,10 | 2,75 ± 0,10 |
| | CČ–OO | 3,15 ± 0,10 | 2,40 ± 0,11 | 2,81 ± 0,09 |
| Kombinace čiridel a vymrazování | CČ–VM | 3,20 ± 0,13 | 2,56 ± 0,12 | 2,90 ± 0,10 |
| | TCA–VM | 3,09 ± 0,10 | 2,42 ± 0,10 | 2,80 ± 0,07 |
| | ACN–VM | 2,58 ± 0,09 | 2,10 ± 0,05 | 2,46 ± 0,09 |
| | OO–VM | 2,99 ± 0,08 | 2,27 ± 0,05 | 2,73 ± 0,05 |

CČ – Carrezova činidla, TCA – trichloroctová kyselina, ACN – acetonitril, OO – zásaditý octan olovnatý, VM – vymrazování

7.2.3 Optimalizace přípravy polotuhých vzorků

Pro optimalizaci extrakce a čiření u polotuhých výrobků byla vybrána plnotučná hořčice Alba, u které výrobce na obalu uvádí celkový obsah cukrů 5,5 g.100ml⁻¹. Co se týká čiření, zjištěné výsledky (Tabulka č. 7) kopírují hodnoty získané u ovocné šťávy. Opět byla jako nejúčinnější čiridla vybrána Carrezova činidla a jako nejméně účinné bylo čiření acetonitrilem a jeho kombinacemi. Bylo vyzkoušeno také vymrazování v kombinaci s jednotlivými čiridly. Výsledky jsou opět srovnatelné nebo jen nevýznamně nižší ve srovnání s použitím samotných čiridel jako tomu bylo u tekutých výrobků. Srovnáme-li teplotu extrakce, pak extrakce při laboratorní teplotě poskytla nižší obsahy všech cukrů než extrakce při 50 °C.

Tento fakt je způsoben tím, že za vyšších teplot dochází k lepšímu přestupu stanovovaných látek do rozpouštědla než za laboratorní teploty a tím je možné vyizolovat sacharidy i ze vzorků, kde je izolace obtížnější [32]. Proto byla pro další experimenty zvolena právě tato teplota.

Tabulka č. 7 Výsledky optimalizace extrakce a čiření polotuhých vzorků

| Teplota extrakce (°C) | | Použité čířidlo | Množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|---|-------------|-------------|
| | | | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza |
| 25 | Jednotlivá čířidla | CČ | 0,62 ± 0,03 | 1,54 ± 0,02 | 2,31 ± 0,10 |
| | | TCA | 0,50 ± 0,02 | 1,47 ± 0,02 | 2,12 ± 0,09 |
| | | ACN | 0,39 ± 0,01 | 1,30 ± 0,01 | 1,92 ± 0,08 |
| | | OO | 0,43 ± 0,02 | 1,42 ± 0,02 | 2,08 ± 0,09 |
| | Kombinace čířidel | CČ–TCA | 0,55 ± 0,02 | 1,51 ± 0,03 | 2,23 ± 0,08 |
| | | CČ–ACN | 0,32 ± 0,02 | 1,38 ± 0,02 | 2,01 ± 0,07 |
| | | CČ–OO | 0,51 ± 0,02 | 1,46 ± 0,03 | 2,07 ± 0,08 |
| | Kombinace čířidel a vymrazování | CČ–VM | 0,61 ± 0,03 | 1,53 ± 0,02 | 2,28 ± 0,08 |
| | | TCA–VM | 0,57 ± 0,02 | 1,46 ± 0,02 | 2,15 ± 0,08 |
| | | ACN–VM | 0,33 ± 0,01 | 1,28 ± 0,01 | 1,90 ± 0,07 |
| | | OO–VM | 0,49 ± 0,02 | 1,41 ± 0,02 | 2,04 ± 0,07 |
| | 50 | Jednotlivá čířidla | CČ | 0,84 ± 0,01 | 1,88 ± 0,02 |
| TCA | | | 0,75 ± 0,03 | 1,80 ± 0,03 | 2,43 ± 0,09 |
| ACN | | | 0,54 ± 0,01 | 1,59 ± 0,02 | 2,18 ± 0,07 |
| OO | | | 0,69 ± 0,02 | 1,71 ± 0,02 | 2,30 ± 0,08 |
| Kombinace čířidel | | CČ–TCA | 0,78 ± 0,03 | 1,82 ± 0,03 | 2,45 ± 0,09 |
| | | CČ–ACN | 0,56 ± 0,02 | 1,63 ± 0,03 | 2,20 ± 0,07 |
| | | CČ–OO | 0,70 ± 0,03 | 1,74 ± 0,04 | 2,31 ± 0,08 |
| Kombinace čířidel a vymrazování | | CČ–VM | 0,82 ± 0,02 | 1,89 ± 0,02 | 2,51 ± 0,09 |
| | | TCA–VM | 0,77 ± 0,02 | 1,78 ± 0,01 | 2,44 ± 0,09 |
| | | ACN–VM | 0,54 ± 0,02 | 1,57 ± 0,02 | 2,16 ± 0,08 |
| | | OO–VM | 0,68 ± 0,01 | 1,71 ± 0,01 | 2,28 ± 0,07 |

CČ – Carrezova činidla, TCA – trichloroctová kyselina, ACN – acetonitril, OO – zásaditý octan olovnatý, VM – vymrazování

7.2.4 Optimalizace přípravy tuhých vzorků

Pro optimalizaci čiřicího kroku u tuhých výrobků byly vybrány grahamové krekry Tuty, u kterých výrobce na obalu uvádí celkový obsah cukrů 6,7 g.100ml⁻¹. S ohledem na čiření

výsledky kopírují hodnoty získané u ovocné šťávy a hořčice (Tabulka č. 8). Opět byla jako neúčinnější čířidla zvolena Carrezova činidla a jako nejméně účinné bylo číření acetonitrilem a jeho kombinacemi. I v tomto případě bylo vyzkoušeno vymrazování v kombinaci s jednotlivými čířidly. Výsledky jsou opět srovnatelné nebo jen nevýznamně nižší ve srovnání s použitím samotných čířidel jako tomu bylo u tekutých i polotuhých výrobků. Podobně jako u hořčice, tak i u krekrů vykazovala vyšší teplota extrakce lepší výsledky s ohledem na množství vyextrahovaných cukrů.

Tabulka č. 8 Výsledky optimalizace extrakce a číření tuhých vzorků

| Teplota extrakce (°C) | | Použité čířidlo | Množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|---|-------------|-------------|
| | | | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza |
| 25 | Jednotlivá čířidla | CČ | 2,41 ± 0,11 | 2,44 ± 0,10 | 0,81 ± 0,04 |
| | | TCA | 2,24 ± 0,11 | 2,30 ± 0,09 | 0,63 ± 0,03 |
| | | ACN | 2,05 ± 0,08 | 2,07 ± 0,08 | 0,50 ± 0,02 |
| | | OO | 2,12 ± 0,10 | 2,23 ± 0,08 | 0,56 ± 0,02 |
| | Kombinace čířidel | CČ–TCA | 2,26 ± 0,10 | 2,36 ± 0,08 | 0,67 ± 0,03 |
| | | CČ–ACN | 2,14 ± 0,08 | 2,09 ± 0,07 | 0,52 ± 0,02 |
| | | CČ–OO | 2,20 ± 0,19 | 2,28 ± 0,07 | 0,61 ± 0,03 |
| | Kombinace čířidel a vymrazování | CČ–VM | 2,38 ± 0,11 | 2,45 ± 0,11 | 0,79 ± 0,04 |
| | | TCA–VM | 2,25 ± 0,10 | 2,29 ± 0,09 | 0,65 ± 0,03 |
| | | ACN–VM | 2,12 ± 0,09 | 2,06 ± 0,07 | 0,49 ± 0,01 |
| | | OO–VM | 2,14 ± 0,19 | 2,27 ± 0,08 | 0,57 ± 0,02 |
| | 50 | Jednotlivá čířidla | CČ | 2,69 ± 0,12 | 2,76 ± 0,10 |
| TCA | | | 2,53 ± 0,11 | 2,62 ± 0,09 | 0,91 ± 0,04 |
| ACN | | | 2,38 ± 0,09 | 2,33 ± 0,07 | 0,79 ± 0,02 |
| OO | | | 2,45 ± 0,10 | 2,57 ± 0,08 | 0,87 ± 0,03 |
| Kombinace čířidel | | CČ–TCA | 2,56 ± 0,11 | 2,67 ± 0,09 | 0,96 ± 0,04 |
| | | CČ–ACN | 2,40 ± 0,08 | 2,35 ± 0,07 | 0,84 ± 0,03 |
| | | CČ–OO | 2,48 ± 0,10 | 2,61 ± 0,08 | 0,90 ± 0,03 |
| Kombinace čířidel a vymrazování | | CČ–VM | 2,67 ± 0,11 | 2,77 ± 0,10 | 1,00 ± 0,04 |
| | | TCA–VM | 2,53 ± 0,11 | 2,60 ± 0,08 | 0,93 ± 0,03 |
| | | ACN–VM | 2,40 ± 0,09 | 2,34 ± 0,07 | 0,81 ± 0,02 |
| | | OO–VM | 2,46 ± 0,10 | 2,59 ± 0,09 | 0,88 ± 0,03 |

CČ – Carrezova činidla, TCA – trichloroctová kyselina, ACN – acetonitril, OO – zásaditý octan olovnatý, VM – vymrazování

7.3 Výsledky stanovení cukrů ve vybraných potravinách

Na základě výsledků optimalizace bylo pro přípravu vzorků zvoleno použití Carrezových činidel jako čířících roztoků a teploty extrakce tuhých a polotuhých vzorků 50 °C.

Výsledky stanovení obsahu cukrů v tekutých výrobcích jsou uvedeny v Tabulce č. 9. U všech analyzovaných sirupů, kromě sirupu Dizzy pomeranč, uvádí výrobce na obalu obsah glukózo-fruktózového sirupu a sacharózy. Podle vyhlášky 76/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů [33], musí obsah glukózy v glukózovo-fruktózovém sirupu převažovat nad obsahem fruktózy. Podle našeho stanovení je tato podmínka splněna. V případě sirupu Dizzy pomeranč převažovala ve složení sacharóza, na rozdíl od ostatních sirupů, u kterých byly zastoupeny všechny tři cukry (fruktóza, glukóza a sacharóza) cca shodně. U agávového sirupu udává výrobce obsah fruktózy minimálně 80 %, což analýza potvrzuje. Množství sacharózy v agávovém sirupu nebylo stanoveno, což znamená, že analyt není ve vzorku přítomen, nebo je jeho množství pod mezí stanovitelnosti použité metody. Do 100 % ovocných šťáv se podle vyhlášky 335/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů [34], nesmí přidávat sacharóza. Analýza džusů prokázala nízkou hladinu cukrů (fruktózy, glukózy a sacharózy), které jsou přirozeně přítomny v ovoci. Do ovocných nápojů se sacharóza přidávat může, ovšem u analyzovaných ovocných šťáv udává výrobce na obalu, že výrobek neobsahuje přidávanou sacharózu. Analýza opět prokázala nízký obsah cukrů, tedy těch, které jsou přirozeně přítomny v ovoci. Odchytky mezi námi stanoveným celkovým obsahem cukrů od údajů uvedených na obalu se pohybovaly mezi $|0,25 - 1,67| \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Výsledky stanovení obsahu cukrů v dalších tekutých výrobcích (energetických a ostatních nápojích) jsou uvedeny v Tabulce č. 10. U analyzovaných energetických nápojů výrobce většinou uvádí na obalu pouze to, že výrobek obsahuje sacharózu. U Red bullu uvádí výrobce, že výrobek obsahuje sacharózu a glukózu. Tyto hodnoty odpovídají, ve výrobku je ještě obsaženo malé množství fruktózy. U výrobku Hot apple uvádí výrobce, že produkt obsahuje sacharózu a glukózu, což analýza opět prokázala. Mléčný výrobek Actimel má na obalu uvedený obsah sacharózy a glukózy, což analýza prokázala. Kromě toho je v Actimelu přítomna i laktóza, což je disacharid přirozeně obsažený v mléce, ze kterého se Actimel vyrábí. Odchytky mezi námi stanoveným celkovým obsahem cukrů od údajů uvedených na obalu se pohybovaly mezi $|0,15 - 0,58| \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Výsledky stanovení obsahu cukrů v polotuhých výrobcích jsou uvedeny v Tabulce č. 11. Podle tvrzení výrobce neobsahuje Sunárek žádnou přidanou sacharózu. Analýzou bylo toto tvrzení prokázáno, z důvodu vyššího obsahu fruktózy a glukózy, které jsou přirozeně přítomny v ovoci, ze kterého je produkt vyroben. Obsah sacharózy byl v tomto výrobku velmi nízký (pod 1 %). Jiné složení je na obalu kojenecké výživy Cvrček. Výrobce uvádí obsah sacharózy, fruktózy, glukózy a maltodextrinu. Analýza potvrdila přítomnost všech cukrů, z nichž největší podíl činí fruktóza, a to z důvodu, že je přirozeně se vyskytující sacharid v ovoci. U medu výrobce množství cukrů neuvádí. Obvyklý obsah refraktometrické sušiny v medu (která je tvořena zejména cukry) je 75 – 85 %, čemuž výsledky naší analýzy odpovídají. Podle vyhlášky 76/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů [33], se připouští maximální obsah sacharózy v medu 5 %. Analyzovaný med tento požadavek splňuje. Na obalu hořčice je pouze uvedeno, že výrobek obsahuje sacharózu. Kromě sacharózy bylo v hořčici detekováno i malé množství fruktózy a glukózy. U kečupu výrobce uvádí, že výrobek obsahuje přidanou sacharózu a škrobový sirup. Analýza prokázala přítomnost většího množství sacharózy, glukózy a maltózy a pak také přítomnost fruktózy. Stanovení prokazuje to, co výrobce na obalu uvádí, protože škrobový sirup obsahuje zejména maltózu a glukózu. Odchyłky mezi námi stanoveným celkovým obsahem cukrů od údajů uvedených na obalu se pohybovaly mezi $|0,24 - 1,24| \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Výsledky stanovení obsahu cukrů v tuhých výrobcích jsou uvedeny v Tabulce č. 12. Analyzované tuhé výrobky obsahovaly pouze sacharidy fruktózu, glukózu a sacharózu. Granko podle analýzy obsahuje pouze sacharózu. Výrobce na obalu uvádí pouze přídavek sacharózy. U vitaminových tablet se obsah cukrů neuvádí, zjištěnou hodnotu tedy nebylo možné s ničím porovnat. Bonbóny Direct energy podle analýzy obsahují pouze glukózu, což odpovídá údajům uvedeným na obalu výrobcem. Chipsy Bohemia mají na obalu uvedený přídavek sacharózy. Analýza potvrdila nepatrnou přítomnost fruktózy, glukózy i sacharózy. Krekry Tuty mají na obalu uvedeno, že obsahují invertní sirup. Invertní sirup ve složení odpovídá analyzované glukóze a fruktóze. Odchyłky mezi námi stanoveným celkovým obsahem cukrů od údajů uvedených na obalu se pohybovaly mezi $|0,22 - 0,54| \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Tabulka č. 9 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tekutých výrobcích (sirupech, ovocných šťávách a nápojích)

| Vzorek | Množství stanovených cukrů (g.100 ml ⁻¹) | | | Celkové množství stanovených cukrů (g.100 ml ⁻¹) | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Odchylka |
|------------------------------------|---|--------------|--------------|---|--|----------|
| | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | | | |
| Relax sirup malina | 20,63 ± 0,97 | 26,05 ± 1,24 | 20,07 ± 0,82 | 66,75 | 67,9 | -1,15 |
| Relax sirup lesní ovoce | 20,03 ± 0,75 | 25,34 ± 1,17 | 21,16 ± 0,91 | 66,53 | 67,2 | -0,67 |
| Dizzy sirup pomeranč | 13,59 ± 0,53 | 15,07 ± 0,58 | 47,13 ± 2,01 | 75,79 | 77,1 | -1,31 |
| Jupí sirup aloe vera | 20,16 ± 0,67 | 25,22 ± 1,09 | 23,95 ± 1,12 | 69,33 | 71,0 | -1,67 |
| Agávodový sirup | 55,24 ± 2,70 | 9,49 ± 0,36 | NS | 64,73 | 65,0 | -0,27 |
| Dizzy orange juice | 3,21 ± 0,12 | 2,54 ± 0,11 | 2,93 ± 0,10 | 8,68 | 9,0 | -0,32 |
| Dizzy apple juice | 5,33 ± 0,27 | 2,24 ± 0,07 | 2,11 ± 0,08 | 9,68 | 10,0 | -0,32 |
| Granini pomeranč | 3,81 ± 0,15 | 1,97 ± 0,05 | 2,67 ± 0,12 | 8,45 | 8,8 | -0,35 |
| Mošt | 5,77 ± 0,34 | 2,35 ± 0,08 | 1,83 ± 0,04 | 9,95 | 10,2 | -0,25 |
| Relax ovocný nápoj pomeranč | 4,11 ± 0,19 | 4,59 ± 0,23 | 1,84 ± 0,06 | 10,54 | 11,0 | -0,46 |
| Relax ovocný nápoj jablko, arónie | 4,42 ± 0,21 | 4,28 ± 0,20 | 1,92 ± 0,07 | 10,62 | 11,0 | -0,38 |
| Relax ovocný nápoj jablko, broskev | 4,58 ± 0,23 | 4,41 ± 0,21 | 1,76 ± 0,07 | 10,75 | 11,0 | -0,25 |

NS – nestanoveneno

Tabulka č. 10 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tekutých výrobcích (energetických a ostatních nápojích)

| Vzorek | Množství stanovených cukrů (g.100 ml ⁻¹) | | | | Celkové množství stanovených cukrů (g.100 ml ⁻¹) | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 ml ⁻¹) | Odchylka |
|-----------------------|--|-------------|-------------|-------------|--|---|----------|
| | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | Laktóza | | | |
| Black energy | 2,34 ± 0,09 | 2,59 ± 0,11 | 4,79 ± 0,25 | NS | 9,72 | 10,3 | -0,58 |
| Red bull | 1,90 ± 0,05 | 3,87 ± 0,20 | 5,08 ± 0,27 | NS | 10,85 | 11,0 | -0,15 |
| Pure-bio energy drink | 3,89 ± 0,19 | 4,22 ± 0,23 | 3,48 ± 0,16 | NS | 11,59 | 12,0 | -0,41 |
| Hot apple | 0,65 ± 0,01 | 7,51 ± 0,41 | 2,53 ± 0,04 | NS | 10,69 | 11,0 | -0,31 |
| Actimel | 0,11 ± 0,00 | 0,22 ± 0,00 | 7,00 ± 0,26 | 2,83 ± 0,09 | 10,16 | 10,5 | -0,34 |

NS – nestanoveno

Tabulka č. 11 Výsledky stanovení obsahu cukrů v polotuhých výrobcích

| Vzorek | Množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | | | | Celkové množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 g ⁻¹) | Odchylka |
|----------------------------------|---|--------------|--------------|-------------|---|--|----------|
| | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | Maltóza | | | |
| Sunárek meruňka | 5,88 ± 0,30 | 2,82 ± 0,13 | 0,92 ± 0,02 | NS | 9,62 | 10,3 | -0,68 |
| Cvrček kojenecká výživa broskvev | 6,15 ± 0,31 | 4,60 ± 0,17 | 2,59 ± 0,12 | 1,52 ± 0,05 | 14,86 | 15,5 | -0,64 |
| Med | 42,56 ± 2,14 | 36,72 ± 1,67 | 1,27 ± 0,04 | NS | 80,55 | – | – |
| Alba plnotučná hořčice | 0,84 ± 0,01 | 1,88 ± 0,02 | 2,54 ± 0,10 | NS | 5,26 | 5,5 | -0,24 |
| Otma jemný kečup Gurmán | 3,62 ± 0,18 | 8,47 ± 0,43 | 10,84 ± 0,49 | 7,03 ± 0,36 | 29,96 | 31,2 | -1,24 |

NS – nestanoveno

Tabulka č. 12 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tuhých výrobcích

| Vzorek | Množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | | | Celkové množství stanovených cukrů (g.100 g ⁻¹) | Množství cukrů uvedené na obalu (g.100 g ⁻¹) | Odchylka |
|------------------------|---|--------------|--------------|---|--|----------|
| | Fruktóza | Glukóza | Sacharóza | | | |
| Granko | NS | NS | 73,46 ± 3,57 | 73,46 | 74,0 | -0,54 |
| Vitaminové tablety | NS | 9,82 ± 0,41 | 1,26 ± 0,06 | 11,08 | – | – |
| Direct energy dextrose | NS | 77,38 ± 3,25 | NS | 77,38 | 77,8 | -0,42 |
| Bohemia chips paprika | 0,14 ± 0,00 | 0,60 ± 0,03 | 0,92 ± 0,04 | 1,66 | 2,0 | -0,34 |
| Tuty kreky graham | 2,69 ± 0,12 | 2,76 ± 0,10 | 1,03 ± 0,05 | 6,48 | 6,7 | -0,22 |

NS – nestanoveno

ZÁVĚR

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí je vhodnou metodou pro analýzu sacharidů v potravinách. Díky vyšší citlivosti oproti dříve používaným metodám poskytuje výsledky o obsažených sacharidech jak kvalitativního, tak kvantitativního charakteru. Obsah sacharidů je důležitým ukazatelem pro vhodnou volbu skladby potravin ke každodennímu konzumu, proto je z výživového hlediska důležité znát konkrétní zastoupení jednotlivých cukrů v obsažených potravinách, které na obalu výrobce mnohdy neuvádí.

V rámci bakalářské práce byla optimalizována příprava vzorků pro stanovení sacharidů pomocí HPLC-RI a následně byl stanovován obsah sacharidů ve vybraných potravinách. Bylo prokázáno, že nejdůležitějším krokem stanovení sacharidů je příprava vzorku. Optimalizací metodiky bylo prokázáno, že nejvhodnější čiřící činidla použitá pro odstranění nežádoucích látek, které by rušily následné stanovení, jsou Carrezova činidla, případně jejich kombinace spolu s vymrazováním. Navržený extrakční postup, který probíhal za teploty 50 °C, byl shledán jako nejefektivnější. V porovnání s extrakcí za laboratorní teploty bylo dosaženo mnohem lepších výsledků.

Analyzovány byly různé druhy potravin, a to výrobky tekuté, polotuhé a tuhé. Výsledky stanovení byly porovnány s údaji, které uvádějí výrobci příslušných potravin na obalech. Zjištěné hodnoty se od údajů udávanými výrobci lišily jen nepatrně. Všechny analyzované obsahy byly trochu nižší, což bylo dáno malými ztrátami během přípravy vzorků. Největší odchylky byly zjištěny v případě analýzy sacharidů v sirupech. Analýzou sacharidů z vybraných potravin pomocí HPLC-RI bylo prokázáno, že navržený postup přípravy vzorku byl vhodný a že metoda analýzy cukrů pomocí HPLC-RI poskytuje relevantní výsledky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] McMURRY John. *Organic chemistry*. 6th ed. Belmont: Thomson-Brooks/Cole, 2004. ISBN 0534390013.
- [2] RAESSLER Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2011, 30, 1833-1843. ISSN 01659936.
- [3] LUZ SANS María a Isabel MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1153, 74-89. ISSN 00219673.
- [4] SHARMA Rajan, YUDHISHHIR S. Rajput Poonam, GAURAV Dogra a Sudhir K. TOMAR. Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk. *International Journal of Dairy Technology*. 2009, 62, 514-519. ISSN 1364727X.
- [5] KUBÁŇ Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 9788073750367.
- [6] KLOUDA Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. přeprac. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.
- [7] VOET Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken: John Wiley, 2011. ISBN 9780470917459.
- [8] COULTATE Tom P. *Food: The chemistry of its components*. 5th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 9780854041114.
- [9] HEß Dieter. *Fyziologie rostlin: vysokoškolská příručka pro přírodovědecké fakulty*. 1. vyd. Překlad Miroslav Dvořák, Jan Krekule, Alena Činčerová. Praha: Academia, 1983.
- [10] ODSTRČIL Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 8070134356.
- [11] McMURRY Susan. *Study Guide & Student Solutions Manual*. 6th ed. Mason: Cengage Learning, 2004. ISBN 0534409342.

- [12] BASAŘOVÁ Gabriela a Ivana ČERNÁ. Stanovení koncentrace cukrů v pivovarnictví. *Kvasný průmysl*. 1977, 23, 145-149. ISSN 00235830.
- [13] MAGWAZA Lembe Samukelo a Umezuruike Linus OPARA. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products. *Scientia Horticulturae*. 2015, 184, 179-192. ISSN 03044238.
- [14] DAVÍDEK Jiří a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vydání. Praha: SNTL, 1981.
- [15] DAVÍDEK Jiří a Jan VELÍŠEK. *Analýza potravin*. Praha: VŠCHT, 1992. ISBN 8070801638.
- [16] NOVÁKOVÁ Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 9788026042433.
- [17] LOUGH W. John a Irving W. WAINER. *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1995. ISBN 0751400769.
- [18] SÝKORA David a Jan FÄHNRIK. Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie. In: *VŠCHT* [online]. Praha: VŠCHT, [cit. 2016-4-28]. Dostupné z: https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/6_LC.pdf
- [19] MEYER Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5th ed. Chichester: Wiley, 2010. ISBN 9780470682173.
- [20] ŠTULÍK Karel a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [21] Manuál SHIMADZU LC-10AD. In: *Univerzita Karlova* [online]. Praha: UK. [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/B2_HPLC.jpg
- [22] NOLLET Leo M. L. a Fidel. TOLDRÁ. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. ISBN 9781439830840.
- [23] BÍLKOVÁ Kateřina a Blanka KRÁLOVÁ. *Izolace biomakromolekul*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 807080288X.
- [24] *Labicom* [online]. [cit. 2016-04-29]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/hplc-uhplc-kolony--predkolony--filtry-95/>

- [25] SNYDER Lloyd R., John J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, 2010. ISBN 9780470167540.
- [26] MOLDOVEANU C. Serban a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC Separations*. Waltham: Elsevier, 2013. ISBN 9780123850133.
- [27] PARRIOTT Donald. *A Practical guide to HPLC detection*. San Diego: Academic Press, 1993. ISBN 0125456808.
- [28] ZAKHAROVA A. M., I. L. GRINSHTEIN a L. A. KARTSOVA. Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. 2013, 68, 1081-1084. ISSN 10619348.
- [29] MANZI Pamela a Laura PIZZOFERRATO. HPLC Determination of Lactulose in Heat Treated Milk. *Food and Bioprocess Technology*. 2013, 6, 851-857. ISSN 19355130.
- [30] ZHANG Zhong, Ruijin YANG, He WANG, Fayin YE, Sha ZHANG a Xiao HUA. Determination of lactulose in foods: a review of recent research. *International Journal of Food Science*. 2010, 45, 1081-1087. ISSN 09505423.
- [31] XINMIN Wang, Zhang RUILI, Lv ZHIHUA, Wang YUANHONG a Jiang TINGFU. Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, 21, 255-258. ISSN 08891575.
- [32] MULLIN W. John a David B. EMMONS. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*. 1997, 30, 147-151. ISSN 09639969.
- [33] ČESKO. Vyhláška ze dne 1. 5. 2004, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbonky, v platném znění. In: *Sbírka právních předpisů 76/2003 Sb.* 2003. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-76-potravinovy.html
- [34] ČESKO. Vyhláška ze dne 31. 12. 1997, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealko-

holicích nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líc, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí, v platném znění. In: *Sbírka právních předpisů 335/1997 Sb. 1997*. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-1997-335-potraviny.html

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|------|---|
| ACN | Acetonitril |
| CAD | Charged Aerosol Detector / Aerosolový detektor nabitých částic |
| CČ | Carrezova činidla |
| ELSD | Evaporative Light Scattering Detector / Odpařovací detektor rozptylu světla |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography / Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance / Nukleární magnetická rezonance |
| OO | Zásaditý octan olovnatý |
| RID | Refractive Index Detector / Refraktometrický detektor |
| SPE | Solid Phase Extraction / Extrakce na pevné fázi |
| TCA | Kyselina trichloroctová |
| TLC | Thin Layer Chromatography / Tenkovrstevná kapalinová chromatografie |
| VM | Vymrazování |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek č. 1 Schéma kapalinového chromatografu SHIMADZU LC-10AD [21] | 21 |
| Obrázek č. 2 Schéma chromatografické kolony [16]..... | 22 |
| Obrázek č. 3 Kalibrační křivka fruktózy | 37 |
| Obrázek č. 4 Kalibrační křivka glukózy | 38 |
| Obrázek č. 5 Kalibrační křivka sacharózy | 38 |
| Obrázek č. 6 Kalibrační křivka maltózy | 39 |
| Obrázek č. 7 Kalibrační křivka laktózy | 39 |
| Obrázek č. 8 Chromatogram směsného standardu cukrů o koncentraci 10 g.l ⁻¹ | 40 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka č. 1 Tekuté výrobky (sirupy, ovocné šťávy a nápoje)..... | 32 |
| Tabulka č. 2 Tekuté výrobky (energetické a ostatní nápoje)..... | 33 |
| Tabulka č. 3 Polotuhé výrobky..... | 33 |
| Tabulka č. 4 Tuhé výrobky..... | 34 |
| Tabulka č. 5 Výsledky stanovení cukrů v roztocích standardů po SPE | 40 |
| Tabulka č. 6 Výsledky optimalizace číření tekutých vzorků | 41 |
| Tabulka č. 7 Výsledky optimalizace číření polotuhých vzorků | 42 |
| Tabulka č. 8 Výsledky optimalizace extrakce a číření tuhých vzorků | 43 |
| Tabulka č. 9 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tekutých výrobcích (sirupech, ovocných šťávách a nápojích) | 46 |
| Tabulka č. 10 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tekutých výrobcích (energetických a ostatních nápojích) | 47 |
| Tabulka č. 11 Výsledky stanovení obsahu cukrů v polotuhých výrobcích | 47 |
| Tabulka č. 12 Výsledky stanovení obsahu cukrů v tuhých výrobcích | 48 |