

# NÁRODNÉ POĽNOHOSPODÁRSKE A POTRAVINÁRSKE CENTRUM

Výskumný ústav potravinársky, Bratislava



## **Analytické metódy a postupy na sledovanie markerov autenticity ovocných štiav a džúsov v rámci projektu APVV 15-0023**

*Spracoval:* Ing. Blanka Tobolková, PhD.  
Ing. Ľubomír Daško, PhD.  
Ing. Elena Belajová  
Ing. Mária Kopuncová  
Ing. Jana Sádecká, PhD.  
Ing. Emil Kolek, PhD.  
Ing. Lenka Butorová  
Ing. Jana Lakatošová, PhD.  
Ing. Božena Skláršová, PhD.  
Ing. Martin Polovka, PhD.

**December 2017**

## Návrh na analýzu ovocných štiav a džúsov – sledované parametre (podľa AIJN, AOAC...)

### Parametre

1. hustota
2. °Brix
3. pH
4. popol
5. formolové číslo
6. celková kyslosť
7. etanol
8. vybrané kovy (AAS)
9. vybrané aminokyseliny
10. esenciálne oleje (GC)
11. GC-MS a GC-O profil
12. HMF
13. kyselina izocitrónová+ostatné kyseliny (kapilárna elektroforéza)
14. antioxidačná aktivita+polyfenoly
15. farba
16. organické kyseliny (HPLC) – *k. vínná, jablčná, L-askorbová, vitamín C citrónová, izocitrónová, jantárová, fumarová, karotenoidy*
17. flavonoidy (HPLC) – *hesperidin, naringin – pomarančové šťavy a džúsy*
18. sacharidy (HPLC) – *fruktóza, glukóza, sacharóza*

### Základné požiadavky na vzorky

- jednoznačne definovaný pôvod a zloženie suroviny
- min. cca. 500-750 ml/vzorky – rozdelené v 2-3 nádobách
- nádoby tmavé, nepriehľadné
- vzorky zmrazené alebo max. schladené, pokiaľ možno s 0-vým“headspaceom“
- prípadne dodané separátne ako dužinu a šťavu pre analýzu olejov – rovnaké podmienky
- zahrnutie sezónneho vplyvu

## Stanovenie vybraných prvkov (Cd, As, Pb, Hg) v ovocných šťavách metódou AAS

### Princíp:

*Cd, As, Pb:* Zriedená vzorka sa nasáva a priamo dávkuje do grafitovej kyvety. Meraný signál sa vyhodnotí metódou kalibračnej priamky. Na zvýšenie citlivosti stanovenia arzénu sa do grafitovej kyvety pridáva modifikačné činidlo - roztok paládia a dusičnanu horečnatého.

*Hg -AMA 254 –:* Ide o jednocelový atómový absorpčný spektrometer na stanovenie ortuti v pevných a kvapalných vzorkách bez mineralizácie vzorky. Využíva techniku generovania pár kovovej ortuti s následným zachytávaním na zlatom amalgámator.

### Prístroje a chemikálie

Atómový absorpčný spektrometer „PERKIN ELMER 4100“ s HGA 700;

Analytické váhy „METLER, presnosti 0,001 g; 0,0001 g a 0,00001 g

Mikrovlnný rozkladný systém Milestone MEGA 1200

AMA 254 (Altec s.r.o., Praha, ČR)

Jednoprvkové štandardné roztoky (Cd, As, Pb, Hg) s certifikovanou koncentráciou 1 g/dm<sup>3</sup> (Merck)

Koncentrovaná kyselina dusičná p.a. (Merck)

Zmesný modifikátor Pd (Merck) a Mg(NO)<sub>2</sub> (Merck)

Vzorky ananásových štiav – Ekvádor, ~~Costa Rica~~, Kostarika, Južná Afrika a Kolumbia

### Pracovný postup AAS

*Príprava vzorky na analýzu*

Mineralizácia mokrou cestou: navážia sa 2,0 g vzorky do teflónovej nádoby a pridajú sa 2 ml kyseliny dusičnej. Uzatvorené teflónové nádoby sa uložia do rotora. Rotor sa vloží do mikrovlnnej piecky a nastaví sa rozkladný program podľa typu matrice. Po ukončení sa rotor vyberie a dá ochladiť do chladiaceho systému na 10 minút. Obsah teflónovej nádoby sa kvantitatívne preniesie do 10 ml odmernej banky a doplní sa objem po značku redestilovanou vodou.

*Analýza prvkov:*

Zmineralizovaná vzorka ananásovej šťavy sa použije na analýzu As, Cd a Pb pomocou AAS.

Podmienky merania	As	Pb	Cd
Vlnová dĺžka (nm)	193,7	283,3	228,8
Prúd vo výbojke (mA)	20	10	7,0
Štrbina (nm)	0,7	0,7	0,7
Pracovné št. roztoky (mg/ dm <sup>3</sup> )	0,05	0,1	0,005
Korekcia pozadia		zapnutá	
Plyn		argón 4.6 (4.8)	

*Potvrdenie správnosti metódy:*

Pred každým meraním na prístroji sa skontrolovala nameraná kalibračná čiara pomocou CRM „Trace element in water“.

*Parametre metódy :*

Kov	As	Pb	Cd
Detekčný limit (mg/kg)	0,004	0,004	0,0003
Medza stanovenia LOQ : (mg/kg)	0,006	0,006	0,0006
Rozsah merania: (mg/kg)	od 0,006 do 1,5	0,006 do 2,5	0,0006 do 1,0
Rozšírená neistota merania :	14 % c <sub>nízke</sub> 16 % c <sub>vysoké</sub> 12 %	16 % c <sub>nízke</sub> 16 % c <sub>vysoké</sub> 10 %	32 % c <sub>nízke</sub> 32 % c <sub>vysoké</sub> 10 %

## **Pracovný postup AMA 254**

### *Analýza Hg:*

Vzorky ananásových štiav sa po napipetovaní do lodičky vysušili, termicky rozložili a spálili. Produkty rozkladu vzorky sú zo spaľovacej trubice vedené do amalgamátora, kde dochádza k meraniu množstva ortuti zachyteného na amalgamátore. Po dokončení automatického nulovania je ortuť z amalgamátora vypudená krátkym intenzívnym zahriatím. Na paneli sa graficky znázorní priebeh absorpcie a výsledky analýzy.

### *Potvrdenie správnosti metódy:*

Pred začiatkom merania skontrolujeme kalibračnú krivku pomocou niektorej kalibračnej úrovne, realizuje sa korekcia lodičky na blank.

Stanovené koncentrácie sledovaných kovov boli porovnané s limitmi uvedenými v legislatíve pre ovocné a zeleninové šťavy Vyhláškou Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky č. 2/1994 Z.z., ktorou sa ustanovujú hygienické požiadavky na cudzorodé látky v požívatinách.

## Základné fyzikálno-chemické parametre

**pH:** pH štiav bolo stanovené pH metricky

**Cukornatosť** (rozpuštná sušina): vyjadrená v °Brix bola stanovená pomocou ručného refraktometra ATC s rozsahom 0-18 °Brix.

**Relatívna hustota:** relatívna hustota  $d_{20\text{ °C}/20\text{ °C}}$  sa stanovuje pyknometricky a predstavuje hmotnosť známeho objemu analyzovanej vzorky pri 20 °C deleného hmotnosťou rovnakého objemu odzdušnenej vody pri 20 °C.

**Titračná kyslosť:** vyjadruje obsah minerálnych a organických kyselín; stanovuje sa titráciou štandardným roztokom hydroxidu sodného do hodnoty pH 8,1. Titračná kyslosť sa vyjadruje v mmol  $\text{H}^+$  na liter ( $c_{\text{H}^+}$ ). Môže byť vyjadrená ako obsah prevažujúcej kyseliny v g/l vynásobením  $c_{\text{H}^+}$  faktorom pre príslušnú kyselinu.

**Formolové číslo:** udáva celkový obsah aminokyselín. Po pridaní roztoku formaldehydu do analyzovanej vzorky sa uvoľní z každej prítomnej molekuly aminokyseliny jeden ión  $\text{H}^+$ , ktorý je následne titrovaný roztokom hydroxidu sodného do hodnoty pH 8,1.

## Stanovenie farebných a antioxidačných charakteristík

### *Stanovenie farebných súradníc*

Absorpčné spektrá štiav (centrifugace 15 000 ot/min, 5 min., 20 °C) boli zmerané v rozsahu 350-800 nm, v 1 nm intervaloch a šírkou štrbiny 0,1 nm, každé spektrum bolo namerané v 4 opakovaníach. Pre účely kolorimetrického porovnania sa použila technika merania farebných súradníc. Z uložených spektier snímaných vo viditeľnej oblasti spektra od 380 do 780 nm, v podmienkach 10° pozorovateľ a štandardný zdroj osvetlenia D65, sa pomocou softvéru Panorama Advanced ColorLite (Labcognition, Shimadzu) vypočítali farebné deskriptory (Tobolková et al., 2013). Z týchto farebných ukazovateľov sú najdôležitejšie trichromatické deskriptory vo farebnom systéme CIE L\*a\*b\* (L\* – merná svetlosť, a\* – odtieň medzi červenou (+a\*) a zelenou (-a\*) a b\* – odtieň medzi žltou (+b\*) a modrou (-b\*). Tieto parametre boli použité aj na výpočet indexu hnednutia (BI) podľa Mascan (2001).

### *Stanovenie celkového obsahu polyfenolov*

Stanovilo sa spektrofotometricky pomocou Folin-Ciocalteuova činidla podľa Tobolková et al. (2013). Výsledky boli vyjadrené ako ekvivalent kyseliny gallovej (GAE, mg/l).

### *TEMPOL test*

Radikál-zhášajúca aktivita štiav oproti radikálu TEMPOL bola stanovená postupom podľa Tobolková et al. (2013). Výsledky boli vyjadrené ako ekvivalent kyseliny askorbovej (AAE, mmol/l) vzhľadom na to, že voľný radikál TEMPOL je citlivý na prítomnosť kyseliny askorbovej a ďalších organických kyselín s podobným redoxným potenciálom. Na prepočet intenzity spektra na AAE bola skonštruovaná kalibračná krivka zo štandardných roztokov kyseliny askorbovej ( $c(\text{AA}) = 0 - 1,82 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$ ).

### *ABTS<sup>•+</sup> test*

Radikál-zhášajúca aktivita štiav oproti radikálu ABTS<sup>•+</sup> bola stanovená postupom podľa Tobolková et al. (2013). Výsledky boli vyjadrené ako Trolox ekvivalent (TEAC, mmol/l).

### **Literatúra**

1. Maskan, M. (2001). Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *Journal of Food Engineering*, 2001, vol. 48, no. 2, pp. 169-175.
2. Tobolková, B., Durec, J., Belajová, E., Mihalíková, M., Polovka, M., Suhaj, M., Daško, L., Šimko, P. Effect of light conditions on physico-chemical properties of pineapple juice with addition of small pineapple pieces during storage. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2013, vol. 52, no. 3, pp. 181-190.

## Stanovenie sacharidov a organických kyselín pomocou HPLC

Na stanovenie sacharidov a organických kyselín v ovocných šťavách sa používa metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) v spojení s refraktometrickým (RID) a diode array (DAD) detektorom. Príprava vzoriek zahrnuje nariadenie šťavy a jej filtráciu cez mikrofilter s pórovitosťou membrány 0,45  $\mu\text{m}$ . Metódy na stanovenie oboch skupín zlúčenín boli vyvinuté vo VÚP-NPPC a vnútrolaboratórne validované.

### Metóda na stanovenie sacharidov

Majoritnými sacharidmi v ovocných šťavách sú fruktóza, glukóza a sacharóza. Na ich stanovenie sa používa kvapalinový chromatograf Pye Unicam a chromatografická kolóna s polárnou fázou Kromasil 100-5  $\text{NH}_2$ , 250 x 4,6 mm i.d. so zrnitosťou sorbentu 5  $\mu\text{m}$ . Mobilnou fázou je zmes acetonitril + voda, 80+20 (v/v) pri prietoku 1,4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nástrek vzorky je 20  $\mu\text{l}$  prostredníctvom manuálneho injektora. Sacharidy sa detegujú refraktometrickým detektorom RID-10A a výsledky sú vyhodnocované pomocou chromatografickej stanice CSW (DataApex).

Validačný parameter	Fruktóza	Glukóza	Sacharóza
LOD [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	0,10	0,10	0,24
LOQ [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	0,45	0,50	0,90
Lineárny rozsah [ $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	0,45 - 90	0,50 - 50	0,90 - 50
Rozšírená neistota merania ( $k=2$ ) v lineárnom rozsahu [%]	4,9 - 3,6	7,7 - 6,5	9,4 - 8,2

LOD = limit detekcie, LOQ = limit stanovenia

### Metóda na stanovenie organických kyselín

Popísanou metódou možno stanoviť tie organické kyseliny, ktoré sú majoritné a charakteristické pre určité typy štiav. Na ich sledovanie sa používa kvapalinový chromatograf Agilent Technologies 1100 Series s DAD detektorom pri vlnovej dĺžke 240 nm (na detekciu kyseliny L-askorbovej) a 214 nm (na detekciu ostatných kyselín). Chromatografickou kolónou je Supelcosil LC-18, 250 x 4.6 mm i.d., so zrnitosťou sorbentu 5  $\mu\text{m}$ . Mobilnou fázou je kyselina fosforečná s koncentráciou 0,01  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pri prietoku 0,7  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Nástrek vzorky je 50  $\mu\text{l}$  prostredníctvom automatického injektora. Na vyhodnotenie výsledkov sa používa chromatografický program ChemStation (Agilent).

Validačný parameter	Kyselina vínná	Kyselina chinová	Kyselina L-jablčná	Kyselina L-askorbová	Kyselina citrónová	Kyselina jantárová	Kyselina fumárová
LOD [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	3,4	3,1	12,8	1,1	10,1	32,4	0,05
LOQ [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	3,6	4,4	16,0	2,5	10,5	32,9	0,07
Lineárny rozsah [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	3,6 - 500	4,4 - 500	16,0 - 5000	2,5 - 250	10,5 - 5000	32,9 - 5000	0,07 - 50
Zhodnosť RSD [%]	6,9 - 2,2	11,4 - 43,3	0,2 - 0,4	0,1 - 0,2	0,7 - 0,2	1,8 - 0,5	0,20 - 0,04

V ovocných šťavách je zastúpená aj kyselina D-izocitrónová, polohový izomér kyseliny citrónovej, ktorá je prítomná v koncentráciách 65-200  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti od typu šťavy a rutinne sa stanovuje enzymaticky. Pri podmienkach tejto metódy sa eluuje spolu s kyselinou L-jablčnou. Separáciu kyseliny D-izocitrónovej od L-jablčnej možno dosiahnuť použitím iného typu kolóny a optimalizáciou separačných podmienok pre tieto dve kyseliny.

## **Analýza prchavých a aróma-aktívnych zložiek**

### **Extrakcia prchavých látok**

Izolácia prchavých látok zo štyroch dodaných vzoriek ananásovej šťavy bola uskutočnená prostredníctvom mikroextrakcie na tuhú fázu z „head-space“ vzorky (HS-SPME). Počas extrakcie bola vzorka ananásovej šťavy (5 ml) inkubovaná spolu s SPME vláknom v 40 ml sklenej vialke v termobloku (Liebisch, Bielefeld, Germany) pri 35 °C po dobu 30 minút. Pre extrakciu bolo použité SPME vlákno DVB/Carboxen/PDMS “For odours“, hrúbka filmu 50/30 µm (57328-U; Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA). Po ukončení extrakcie boli prchavé látky postupne desorbované z SPME vlákna v injektore plynového chromatografu v priebehu analýzy.

### **GC-MS analýzy**

Prchavé zlúčeniny extrahované prostredníctvom HS-SPME boli analyzované metódou GC-MS, pričom bol použitý plynový chromatograf Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) spojený s hmotnostne-spektrometrickým detektorom 5973 inert (Agilent Technologies). Separácia prchavých látok prebiehala na kolóne DB-WAXetr (30 m × 0,25 mm × 0,50 µm; J&W 122-7333, Agilent Technologies) pri teplotnom programe 40 °C (1 min), 5 °C/min, 220 °C. Lineárna prietoková rýchlosť nosného plynu hélia bola 35 cm/s (merané pri 143 °C). Injektor chromatografu pracoval v split režime (split ratio 1:2) a jeho teplota bola 250 °C.

### **GC-FID/O analýzy**

Paralelne s GC-MS analýzami boli HS-SPME extrakty ananásových štiav analyzované aj prostredníctvom GC-FID/O techniky pričom bola využitá metóda posteriórneho odhadu intenzity jednotlivých zaznamenaných odorických vnemov. Výsledky GC-FID/O analýz boli následne vyjadrené ako priemerné hodnoty odorických intenzít v škále od 0 po 3 (s medzistupňom 0,5) získané z troch nezávislých meraní.

Analýzy boli uskutočnené na plynovom chromatografe Agilent 7890A (Agilent Technologies) spojenom s plameňovo-ionizačným detektorom (FID) a olfaktorickým detekčným portom ODP3 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany). Separácia látok prebiehala na kolóne DB-WAXetr (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm; J&W 123-7032, Agilent Technologies) pri teplotnom programe 35 °C (1 min), 5 °C/min, 220 °C. Lineárna prietoková rýchlosť nosného plynu vodíka bola 46,684 cm/s (merané pri 143 °C). Injektor chromatografu pracoval v splitless režime a jeho teplota bola 250 °C. Olfaktorický detekčný port operoval bol vyhrievaný pri teplote 180 °C, teplota rozhrania medzi ODP a výstupom z plynového chromatografu bola 230 °C, prietok pridaného dusíka v ODP zvlhčovači bol 12 ml/min.

### **Identifikácia a semi-kvantitatívna analýza prchavých látok**

Separované individuálne prchavé zlúčeniny v jednotlivých vzorkách boli identifikované na základe porovnania ich lineárnych retenčných indexov s tabelovanými dátami nameranými na referenčných štandardných zlúčeninách, porovnaním ich hmotnostných spektier so spektrami z dostupných GC-MS databáz, individuálnymi GC analýzami štandardných látok a taktiež porovnaním nameraných dát s údajmi v dostupnej literatúre. Lineárne retenčné indexy boli vypočítané s použitím rovnice podľa Van den Doola a Kratza [1], pričom bola použitá štandardná zmes n-alkánov C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>. Pre identifikáciu nameraných hmotnostných spektier boli využité dostupné knižnice spektier Wiley a NIST MS (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland, USA). Relatívny obsah jednotlivých prchavých látok bol vypočítaný metódou vnútornej normalizácie a vyjadrený formou percentuálneho zastúpenia.

### **Literatúra**

[1] Van den Dool, H. & Kratz, P. D. (1963). A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* **11**, 463-471.



## Stanovenie aminokyselín metódou HPLC/QQQ

Aminokyseliny v ananásovej šťave z Kostariky boli analyzované prostredníctvom kvapalinového chromatografu Agilent 1200 series (Agilent, Technologies, Waldbronn, Germany) prepojeného s detektorom Agilent 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Na separáciu jednotlivých zlúčenín bola použitá kolóna Purospher Star RP-8ec (150 mm x 4,6 mm x 3 µm, Merck, Darmstadt, Germany). Teplota kolóny počas analýzy bola udržiavaná na 25 °C. Mobilná fáza pozostávala zo 100 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 1 ml kyseliny octovej (Fischer Scientific, Loughborough, UK) a 500 ml 0,05 mM vodného roztoku kyseliny perfluorooktánovej (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Prietok mobilnej fázy počas analýzy bol 0,5 ml/min.

Pre detekciu aminokyselín bol zvolený MRM mód, ktorý je založený na generácii protonovaných molekulárnych iónov jednotlivých aminokyselín, ako aj vnútorného štandardu (d3-glutámovej kyseliny) a ich následnom štiepení v kolíznej cele na fragmentové (produktové) ióny, špecifické pre dané aminokyseliny. Pre každú aminokyselinu boli optimalizované najvhodnejšie podmienky fragmentácie (napätie na fragmentore, energia v kolíznej cele), s cieľom dosiahnuť čo najvyššiu odozvu vybraných fragmentových iónov.

Vzorka ananásovej šťavy (10 ml) bola pred analýzou upravená centrifugáciou (4500 rpm po dobu 10 minút), aby sa odstránil tuhý podiel. Supernatant bol následne zriedený 0,1% vodným roztokom kyseliny octovej v pomere 1:100 a zároveň bol ku vzorke pridaný aj vnútorný štandard. Pred samotnou analýzou bola zriedená vzorka ešte prefiltrovaná cez 0,45 µm filter. Kvantifikácia jednotlivých aminokyselín v reálnej vzorke bola uskutočnená na základe kalibračných závislostí, ktoré boli zostrojené prostredníctvom analýzy siedmich zmesných štandardných roztokov aminokyselín s koncentráciou od 0,02 až po 6 µg/ml.

## Stanovenie 5-hydroxymetyl-2-furaldehydu (HMF)

Na stanovenie používame kvapalinovú chromatografiu s gradientovou elúciou, separáciou na kolóne Zorbax SB C18, 5 mm. Na detekciu sa používa UV/VIS detektor pri vlnovej dĺžke 280 nm.

V Tabuľke 1 sú uvedené podmienky gradientu.

Tabuľka 1. HPLC gradient použitý na stanovenie HMF

Čas [min]	Objem zložky v mobilnej faze [% v/v]		
	Metanol	Voda (0,01 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Acetonitril
0	0	100	0
1.5	2	95	3
2.1	2	95	3
3	8	86	6
11	8	86	6
11.5	94	0	6
20	94	0	6
20.1	2	95	3
30	2	95	3

Na stanovenie sa použije externá kalibrácia v rozsahu od 0,2 do 170 mg/kg. Výsledky nižšie potvrdzujú linearitu v tomto rozsahu. Zvolili sme 7 bodovú kalibráciu s opakovaným nástrekom vzhľadom na vysoký rozsah koncentrácií.

Tabuľka 2. Kalibrácia pre stanovenie HMF.

	C mg/kg	Area
1	0,1672	25,7
1	0,1672	26
2	0,836	125
2	0,836	124,5
3	8,36	1255
3	8,36	1270
4	16,72	2541
4	16,72	2514
5	41,8	6054
5	41,8	6077
6	83,6	12169
6	83,6	12175
7	167,2	24259
7	167,2	24292

Metrologické parametre metódy:

Regresná štatistická hodnota R – 0,999829, R<sup>2</sup> – 0,999657, Štandardná odchýlka – 0,036

Limit detekcie (LOD) – 0,20 mg/kg, Limit kvantifikácie (LOQ) – 0,67 mg/kg

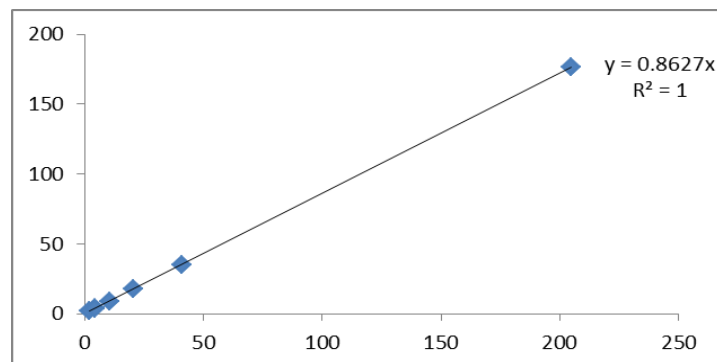
Pri spracovaní vzoriek jedinou operáciou je filtrovanie šťavy. Po prefiltrovaní je vzorka pripravená na nástrek na separačnú kolónu.

## Stanovenie kyselín jablčnej a isocitrónovej

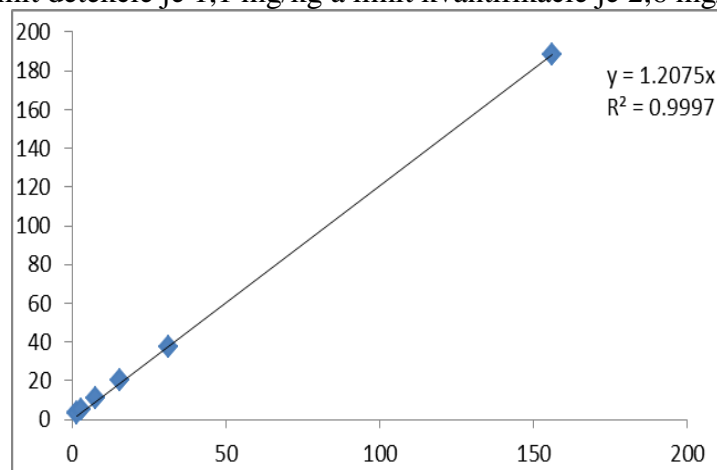
Na stanovenie oboch kyselín sa používa kolóna od Firmy Phenomenex s rozmermy 250x 4,6 mm. Použitý sorbent je Synergy 4  $\mu\text{m}$  Hydro RP 80 A. Pomocou izokraticej separácie s použitím vodného roztoku kyseliny fosforečnej (pH 2,3) dosiahneme spoľahlivú separáciu oboch kyselín a eventuálnych prímiesí. Detekcia požadovaných kyselín sa robí pomocou detektora UV/VIS pri vlnovej dĺžke 205 nm.

Práve vďaka vyššie opísanej kolóne je možné spoľahlivo oddeliť aj L a D izoméry kyseliny jablčnej. Uvedené požiadavka je dôležitá pre odhalenie prípadného falšovania ovocných šťiav, nakoľko v prírodných šťavách sa vyskytuje len L forma kyseliny jablčnej ale pri syntetickej výrobe sa vyrobí vždy zmes L a D formy kyseliny jablčnej. Preto uvedený postup vďaka využitiu vybranej kolóny je vhodný aj na eventuálne potvrdenie nepovoleného prídavku kyseliny jablčnej do šťavy.

Na stanovenie sa využíva externá kalibrácia. Pre ilustráciu sú uvedené kalibračné čiary pre obe kyseliny,



Obrázok 1. Kalibračná čiara pre kyselinu isocitrónovú.  
Limit detekcie je 1,1 mg/kg a limit kvantifikácie je 2,6 mg/kg.



Obrázok 2. Kalibračná čiara pre kyselinu L-jablčnú.  
Limit detekcie je 1,3 mg/kg a limit kvantifikácie je 4,3 mg/kg.

## Štatistická analýza

Štatistické výpočty sú realizované pomocou štatistického softvérového balíka UNISTAT v.6.0 (UNISTAT Londýn, Veľká Británia).

Experimentálne dáta – z hľadiska vplyvu použitej produkčnej atmosféry ako aj skladovania - boli spracované pomocou analýzy variancie (ANOVA) využitím Turkey HSD testu, pričom štatistická významnosť rozdielov bola testovaná na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Rozdiely boli považované za štatisticky významné, ak hodnota  $P < 0,05$  a štatisticky veľmi významné, ak hodnota  $P < 0,01$ .

Z multivariačných štatistických metód sa uvažuje využitie metódy hlavných komponentov (principal component analysis, PCA), faktorovej analýzy a kanonickej diskriminačnej analýzy (Canonical discriminant analysis, CDA).

Metóda hlavných komponentov (PCA, Principal component analysis) patrí do skupiny multivariačných metód, využívaných pri analýze skrytých vzťahov medzi premennými tak, že sa transformuje veľký počet potenciálne korelujúcich experimentálne zistených parametrov - premenných - na menší počet nekorelujúcich a vzájomne nezávislých hlavných komponentov. Komponenty sú konštruované tak, že prvá hlavná komponenta opisuje maximum variability študovaného systému (vlastnosti študovaných vzoriek) a každá ďalšia komponenta opisuje maximum zostatkovej variability. Jednotlivé pôvodné premenné majú v príslušnej komponente svoju váhu - vlastné vektory - pomocou ktorých môžeme posudzovať vplyv príslušnej premennej na variabilitu v rámci danej komponenty.

Kanonickej diskriminačnej analýzy (CDA - Canonical discrimination analysis) skúma zákonitosti v rozdelení do skupín (diskriminačné funkcie) a formuluje pravidlo (klasifikačné funkcie), ktoré umožnia zaradiť nový objekt do konkrétnej skupiny. Diskriminačná analýza hľadá a vypočítava diskriminačné funkcie, pričom berie do úvahy všetky nezávislé premenné. Do diskriminačnej funkcie vstupujú premenné postupne a vyberá sa vždy tá, ktorá má pre diskrimináciu najväčší prínos.