VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ OBSAHU ORGANICKÝCH KYSELIN V ALKOHOLICKÝCH NÁPOJÍCH
MONITORING OF ORGANIC ACID CONTENT IN ALCOHOLIC DRINKS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE Bc. Katarína Ostrihoňová
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Karolína Benešová, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1054/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka:	**Bc. Katarína Ostrihoňová**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce:	**Ing. Karolína Benešová, Ph.D.**
Akademický rok:	2016/17

Název diplomové práce:

Sledování obsahu organických kyselin v alkoholických nápojích

Zadání diplomové práce:

1) Zpracování přehledné literární rešerše
2) Optimalizace analytických metod stanovení (ITP, HPLC/UV)
3) Analýza reálných vzorků alkoholických nápojů
4) Vyhodnocení výsledků a porovnání s aktuální literaturou

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Katarína Ostrihoňová student(ka)	Ing. Karolína Benešová, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom diplomovej práce je stanovenie a optimalizácia stanovenia organických kyselín v pivách metódou kapilárnej izotachoforézy a vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s UV detekciou. Pivo je zložitá matrica a preto vyžaduje úpravu pred analýzou HPLC. V diplomovej práci je diskutovaná optimalizácia metód (HPLC/UV a CITP) i optimalizácia úpravy vzorku, konkrétne extrakciou na pevnej fázy (SPE). V teoretickej časti je spracovaná história, charakteristika a technológia výroby piva. Ďalej sú popísané organické kyseliny a metódy stanovenia organických kyselín použité v tejto práci. Experimentálna časť obsahuje prípravy roztokov, vzoriek a kalibračných štandardov, parametre a postupy analýzy HPLC/UV, CITP a postup úpravy vzorku pomocou SPE. V diskusii a závere sú zhrnuté všetky výsledky a porovnané s aktuálnou literatúrou. Bolo analyzované 11 pív z obchodnej siete. Vo všetkých vzorkách bol stanovený obsah 6 organických kyselín (mliečna, šťaveľová, jantárová, octová, citrónová, benzoová) metódou CITP a 5 organických kyselín (mliečna, šťaveľová, jantárová, octová, citrónová) metódou HPLC/UV. Výsledky práce podávajú prehľad o obsahu organických kyselín vo vzorkách analyzovaných pív.

ABSTRACT

The aim of the thesis is determination and optimization of organic acids in beers using the methods of capillary isotachophoresis (CITP) and high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC/UV). Beer is a complicated matrix therefore the samples need pretreatment using solid phase extraction (SPE). The diploma thesis discusses the optimization of the analytical methods (HPLC/UV and CITP) and optimization of SPE. In the theoretical part, history, characterization and technology of beer production are presented. Further, characteristics of organic acids and methods for organic acid determination are also discussed. The experimental part deals with the preparation of solutions, tested samples, calibration samples. Parameters and procedures of analytical methods (HPLC/UV and CITP) and pretreatment using the solid phase extraction are also described in the experimental part. All results are summarized and compared with the current literature in discussion and conclusion. Eleven beer samples from the retail stores were analyzed. In all samples, six organic acids (lactic, oxalic, succinic, acetic, citric, benzoic) were determined by CITP and five organic acids (lactic, oxalic, succinic, acetic, citric) by HPLC/UV were determined. Results of this study give an overview of the organic acid contents in beer samples.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ:

Organické kyseliny, pivo, HPLC, SPE, CITP

KEY WORDS:

Organic acids, beer, HPLC, SPE, CITP

OSTRIHOŇOVÁ, K. *Sledování obsahu organických kyselin v alkoholických nápojích.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 104 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Karolína Benešová, Ph. D.

PREHLÁŠANIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať vedúcej diplomovej práce Ing. Karolíně Benešové, Ph. D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej diplomovej práce. Ďalej by som rada poďakovala pani laborantkám z VÚPS paní Kopečkové a Vandžurové, za praktické rady a pomoc pri práci v laboratóriu a ďalším pracovníkom Výskumného ústavu pivovarského a sladarského, a. s., Brno. V neposlednej rada by som sa chcela poďakovať mojej konzultantke prof. RNDr. Ivaně Márové. CSc. za poskytnutie užitočných rád a pripomienok, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto diplomovej práce.

Diplomová práca bola vypracovaná v rámci projektu TAČR TE02000177 „Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovín a výrobkov“.

OBSAH

Zoznam obrázkov ..... **x**

Zoznam tabuľiek ..... **xii**

1 Úvod **1**

2 Teoretická časť **2**

2.1 História piva 2

2.2 Charakteristika piva 2

2.3 Suroviny pre výrobu piva 2

2.3.1 Slad 2

2.3.1.1 Výroba sladu 3

2.3.2 Chmeľ 5

2.3.3 Voda 6

2.3.4 Pivovarské kvasinky 6

2.4 Výroba piva 7

2.4.1 Výroba mladiny 8

2.4.1.1 Šrotovanie 8

2.4.1.2 Vystieranie 8

2.4.1.3 Rmutovanie 9

2.4.1.4 Sciedzanie sladiny 9

2.4.1.5 Výroba mladiny (Chmeľovar) 10

2.4.1.6 Chladenie mladiny a separácia hrubých kalov 10

2.4.1.7 Kvasenie mladiny 10

2.4.1.8 Záverečné úpravy piva 11

2.5 Látky prítomné v pive 13

2.6 Organické kyseliny 13

2.6.1 Kyselina citrónová 14

2.6.1.1 Použitie kyseliny citrónovej 14

2.6.2 Kyselina octová 15

2.6.3 Kyselina mliečna 15

2.6.3.1 Formy kyseliny mliečnej 16

2.6.3.2 Použitie kyseliny mliečnej 16

2.6.4 Kyselina šťaveľová 17

2.6.5 Kyselina jantárová 17

2.6.6 Kyselina benzoová 18
2.6.7 Faktory ovplyvňujúce obsah organických kyselín v pive 18
2.6.7.1 pH piva 18
2.6.7.2 Kvasinkový kmeň 18
2.6.7.3 Zdroj dusíku 19
2.7 Elektroseparačné metódy pre analýzu organických kyselín v pive 19
2.7.1 Elektroforéza 19
2.7.2 Elektroforetická pohyblivosť 19
2.7.2.1 Efektívna pohyblivosť 20
2.7.3 Elektroosmotický tok a elektroosmóza 20
2.7.4 Molekulárna difúzia 21
2.8 Izotachoforéza 21
2.8.1 Inštrumentácia 22
2.8.2 Množstvo a charakter vzorku 22
2.8.3 Základné údaje 22
2.8.4 Používané elektrolytové systémy 23
2.8.4.1 Podmienky pre vhodný elektrolytový systém 23
2.8.4.2 Rozdelenie elektrolytových systémov 23
2.8.5 Izotachoforetická analýza 23
2.8.6 Separácia a detekcia 25
2.8.7 Detektory 26
2.8.7.1 Univerzálne detektory 26
2.8.7.2 Špecifické detektory 26
2.8.8 Výsledok analýzy 27
2.8.8.1 Kvalitatívna analýza 28
2.8.8.2 Kvantitatívna analýza 28
2.8.9 Využiteľnosť metódy 28
2.8.9.1 Využitie kapilárnej izotachoforézy v analýze potravín 29
2.8.10 Porovnanie izotachoforezy s inými analytickými metódami 29
2.8.11 Presnosť a citlivosť metódy 29
2.9 Chromatografia 30
2.9.1 Princíp separácie 30
2.9.2 Inštrumentácia 30
2.9.2.1 Príprava MF 31
2.9.2.2 Dodávanie MF 31
2.9.2.3 Dávkovanie 32

2.9.2.4 Separácia 32
2.9.2.5 Detekcia 33
2.9.2.6 Riadenie a zber dát 36
2.9.3 Vyhodnotenie výsledkov v HPLC 36
2.9.3.1 Kvantitatívna analýza 36
2.9.3.2 Kvalitatívna analýza 36
2.9.4 Využitie HPLC 37
2.9.5 Možnosti úpravy vzorku pred chromatografickou analýzou 37

3 Cieľ práce 38

4 Experimentálna časť 39

4.1 I. metóda stanovenia organických kyselín v pive (CITP) 39
4.1.1 Laboratórne vybavenie a prístroje 39
4.1.1.1 Parametre elektroforetického analyzátoru EA 101 39
4.1.2 Použité chemikálie 40
4.1.3 Vzorky 40
4.1.3.1 Úprava vzorky 40
4.1.4 Príprava roztokov 40
4.1.4.1 Príprava vodiaceho elektrolytu 41
4.1.4.2 Príprava koncového elektrolytu 41
4.1.4.3 Príprava zásobných roztokov organických kyselín 41
4.1.4.4 Príprava kalibračných roztokov organických kyselín 41
4.1.4.5 Príprava roztokov pre štandardný prídavok (príprava mixu) 42
4.1.4.6 Príprava zmiešaného štandardu 42
4.1.5 Analýza piva pomocou CITP 42
4.1.5.1 Postup merania 42
4.1.5.2 Postup dávkovania vzorku 43
4.1.5.3 Postup čistenia po skončení analýzy 43
4.2 II. metóda stanovenia organických kyselín v pive (HPLC/UV) 44
4.2.1 Laboratórne vybavenie a prístroje 44
4.2.2 Použité chemikálie 45
4.2.3 Vzorky 45
4.2.3.1 Úprava vzorky pred analýzou HPLC/UV 45
4.2.4 Príprava roztokov 47
4.2.4.1 Príprava 0,05 M dihydrogénfosforečnanu sodného monohydrátu 47
4.2.4.2 Príprava 0,05 M kyseliny sírovej 47

4.2.4.3 Príprava 1 M kyseliny chlorovodíkovej 48
4.2.4.4 Príprava 0,1 M NaOH....48
4.2.4.5 Príprava 50 % - ného NaOH....48
4.2.5 Príprava štandardných roztokov organických kyselín 48
4.2.5.1 Príprava zmiešaného štandardu....48
4.2.5.2 Príprava mixu 2x viac....48
4.2.5.3 Príprava mixu 5x viac....48
4.2.5.4 Príprava vzorky pre stanovenie matricového efektu 49
4.2.5.5 Príprava kalibrácie do matrice 49
4.2.6 Analýza a detekcia piva pomocou HPLC/UV 49

5 Výsledky 50

5.1 Stanovenie organických kyselín pomocou CITP 50
5.1.1 Analýza zmiešaného štandardu....53
5.1.2 Štatistické spracovanie výsledkov z CITP....53
5.1.2.1 Medza stanovitelnosti (kvantifikácie) - LOQ 53
5.1.2.2 Medza detekcie - LOD 54
5.1.2.3 Linearita a rozsah metódy....55
5.1.2.4 Presnosť metódy....56
5.1.2.5 Výťažnosť 56
5.2 Stanovenie organických kyselín pomocou HPLC....57
5.2.1 Štatistické spracovanie výsledkov 59
5.2.1.1 Medza stanovitelnosti (kvantifikácie) - LOQ 59
5.2.1.2 Medza detekcie (LOD) 60
5.2.1.3 Linearita a rozsah metódy....60
5.2.1.4 Presnosť metódy (opakovateľnosť nástreku)....61
5.2.1.5 Výťažnosť 62

6 Diskusia 63

6.1 Optimalizácia extrakčných podmienok 63
6.2 Optimalizácia chromatografických podmienok 63
6.3 Stanovenie organických kyselín metódou CITP....63
6.4 Stanovenie organických kyselín metódou HPLC/UV....64
6.5 Diskusia štatistického vyhodnotenia výsledkov 65
6.5.1 Medza detekcie a medza kvantifikácie CITP 65
6.5.2 Linearita....65

6.5.3 Opakovateľnosť CITP 65
6.5.4 Opakovateľnosť HPLC 66
6.5.5 Výťažnosť u metódy CITP 66
6.5.6 Výťažnosť u metódy HPLC 66
6.5.7 Porovnanie výťažností organických kyselín u oboch metód stanovenia 66

7 Záver 67

8 Zoznam použitej literatúry 68

9 Zoznam použitých skratiek 72

10 Prílohy 73

10.1 Stanovenie organických kyselín pomocou kapilárnej izotachoforézy 73
10.1.1 Kalibračné krivky organických kyselín 73
10.1.2 Izotachoforegramy štandardov 76
10.1.3 Izotachoforegramy vzoriek zo sady 11 pív 79
10.2 Stanovenie organických kyselín pomocou HPLC/UV 84
10.2.1 Kalibračné krivky organických kyselín 84

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Schéma výroby sladu [16].....3
Obr. 2: Schéma výroby piva [16].....7
Obr. 3: Premena etanolu na kyselinu octovú [3].....15
Obr. 4: Elektroforetický analyzátor EA 101.....22
Obr. 5:Schéma izotachoforetickej analýzy [25].....25
Obr. 6: Izotachoforegram [27].....27
Obr. 7: Inštrumentácia vysokoúčinného kvapalinového chromatografu.....31
Obr. 8: Polohy dávkovača vzorku [34].....43
Obr. 9: Postup extrakcie na tuhú fázu [30].....46
Obr. 10: Aparatúra pre extrakciu.....47
Obr. 11: Izotachoforegram zmiešaného štandardu.....53
Obr. 12: Príklad vyhodnotenia medze kvantifikácie pre kyselinu citrónovú.....54
Obr. 13:Zobrazenie princípu výpočtu limitu detekcie [33].....60
Obr. 14: Kalibračná krivka pre kyselinu mliečnu.....73
Obr. 15:Kalibračná krivka pre kyselinu šťaveľovú.....73
Obr. 16: Kalibračná krivka pre kyselinu citrónovú.....74
Obr. 17:Kalibračná krivka pre kyselinu octovú.....74
Obr. 18: Kalibračná krivka pre kyselinu jantárovú.....75
Obr. 19: Kalibračná krivka pre kyselinu benzoovú.....75
Obr. 20: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu mliečnu.....76
Obr. 21: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu šťaveľovú.....76
Obr. 22: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu citrónovú.....77
Obr. 23: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu octovú.....77
Obr. 24: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu jantárovú.....78
Obr. 25: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu benzoovú.....78
Obr. 26: Izotachoforegram vzorku piva č. 1.....79
Obr. 27: Izotachoforegram vzorku piva č. 2.....79
Obr. 28: Izotachoforegram vzorku piva č. 3.....80
Obr. 29: Izotachoforegram vzorku piva č. 4.....80
Obr. 30: Izotachoforegram vzorku piva č. 5.....81
Obr. 31:Izotachoforegram vzorku piva č. 6.....81
Obr. 32: Izotachoforegram vzorku piva č. 7.....82

Obr. 33: Izotachoforegram vzorku piva č. 8. 82
Obr. 34: Izotachoforegram vzorku piva č. 9. 83
Obr. 35:Izotachoforegram vzorku piva č. 10. 83
Obr. 36: Izotachoforegram vzorku piva č. 11. 84
Obr. 37: Kalibračná krivka pre kyselinu mliečnu. 84
Obr. 38: Kalibračná krivka pre kyselinu šťaveľovú. 85
Obr. 39: Kalibračná krivka pre kyselinu citrónovú. 85
Obr. 40: Kalibračná krivka pre kyselinu octovú. 86
Obr. 41: Kalibračná krivka pre kyselinu jantárovú. 86
Obr. 42:Chromatogram zmiešaného štandardu. 87
Obr. 43: Chromatogram zmiešaného štandardu z kalibrácie do matrice. 88
Obr. 44: Chromatogram zmiešaného štandardu bez matrice, preložený chromatogramom zmiešaného štandardu s matricou.....89
Obr. 45: Chromatogram vzorky piva po úprave extrakciou SPE.....90
Obr. 46: Chromatogram vzorky piva bez úpravy extrakciou SPE. 91

ZOZNAM TABUĽIEK

Tab. 1: Výhody a nevýhody prietokovej pasterizácie [18]. 12
Tab. 2: Vlastnosti niektorých organických kyselín [20]. 13
Tab. 3: Obsah vybraných organických kyselín v pive [19]. 14
Tab. 4: Základné parametre pre kapilárnu izotachoforézu [9]. 29
Tab. 5: Vlastnosti analyzátora a parametre merania. 39
Tab. 6: Zoznam analyzovaných vzoriek pív. 40
Tab. 7: Hodnoty pre prípravu zásobných roztokov organických kyselín. 41
Tab. 8: Hodnoty pre prípravu kalibračných roztokov. 42
Tab. 9: Hodnoty koncentrácie organických kyselín v zásobných roztokoch a zmiešanom štandarde. 42
Tab. 10: Parametre chromatografického systému. 44
Tab. 11: Zoznam analyzovaných vzoriek pív. 45
Tab. 12:Hodnoty navážok a koncentrácií pre zmiešaný štandard. 48
Tab. 13: hodnoty pre prípravu kalibrácie do matrice. 49
Tab. 14: Výsledky analýzy organických kyselín vzorku č. 1. 50
Tab. 15: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 2. 50
Tab. 16: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 3. 50
Tab. 17: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 4. 51
Tab. 18: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 5. 51
Tab. 19: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 6. 51
Tab. 20:Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 7. 51
Tab. 21: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 8. 52
Tab. 22: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 9. 52
Tab. 23: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 10. 52
Tab. 24: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 11. 52
Tab. 25: Výsledné hodnoty namerané pre zmiešaný štandard. 53
Tab. 26: Medze kvantifikácie a detekcie pre všetkých 6 organických kyselín. 54
Tab. 27: Hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín. 55
Tab. 28: Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre kalibračné krivky organických kyselín 55
Tab. 29: Výsledné hodnoty pre opakovateľnosť vzorky piva. 56
Tab. 30: Výsledné hodnoty koncentrácii a výťažnosti organických kyselín. 57

Tab. 31: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 1. 57
Tab. 32: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 2. 57
Tab. 33: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 3. 58
Tab. 34: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 4. 58
Tab. 35: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 5. 58
Tab. 36: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 6. 58
Tab. 37: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 7. 58
Tab. 38: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 8. 59
Tab. 39: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 9. 59
Tab. 40: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 10. 59
Tab. 41: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 11. 59
Tab. 42: Hodnoty limitov detekcie a kvantifikácie organických kyselín. 60
Tab. 43: Hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín. 61
Tab. 44: Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre kalibračné krivky organických kyselín. 61
Tab. 45: Hodnoty plôch píkov a opakovateľnosti pre 5 organických kyselín. 62
Tab. 46: Hodnoty výťažnosti pre mix 2 krát viac a pre mix 5 krát viac.....62
Tab. 47: Porovnanie limitov kvantifikácie a detekcie pre obe metódy. 65
Tab. 48: Hodnoty korelačných koeficientov u oboch metód stanovenia organických kyselín.65
Tab. 49: Výťažnosti organických kyselín u oboch metód stanovenia.....66

1 ÚVOD

Pivo pozostáva z veľkého množstva zlúčenín ako sú polyfenolické látky pochádzajúce z jačmeňa a sladu, horké látky z chmeľu, farbivá, ktoré vznikajú ako produkty karamelizácie cukrov, produkty kvasenia (CO_2, etanol), organické a anorganické látky, sacharidy, dusíkaté látky, malé množstvo vyšších prchavých alkoholov, aldehydov, esterov, lipidov a v neposlednej rade pivo obsahuje vitamíny skupiny B [1].

Táto diplomová práca sa zaoberá sledovaním obsahu organických kyselín v pive. Organické kyseliny majú význam v pive ako chuťové a vonné látky, ovplyvňujú pH piva a náchylnosť na napadnutie iným nežiadúcim organizmom. Medzi organické kyseliny, ktoré sa najčastejšie stanovujú v pive patria: kyselina citrónová, jablčná, jantárová, mliečna, octová, šťaveľová. Na stanovenie organických kyselín je veľké množstvo dostupných metód ako napríklad iónová chromatografia, HPLC, kapilárna elektroforéza a jej techniky ako je CZE a CITP. V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na stanovenie organických kyselín v pive pomocou metódy HPLC/UV a CITP s vodivostnou detekciou [2, 5].

Molekuly organických látok môžu niesť záporný náboj v dôsledku disociácie alebo kladný náboj v dôsledku protonizácie. Vďaka tomu môžu byť organické kyseliny stanovené pomocou izotachoforézy, ktorá umožňuje stanovenie ionogénych látok [6, 7, 8].

Hladiny obsahu organických kyselín vo vzorkách sú vo väčšine prípadov dostačujúce k priamemu stanoveniu bez úpravy vzorku prípadne vyžadujú iba minimálne predbežné úpravy ako je zriedenie alebo filtrácia. Aj napriek tomu, že je pivo zložitá heterogénna matrica, tak látky, ktoré by mohli interferovať so sledovanými analytmi sú neionogéne, teda nerušia stanovenie. Cena prístrojového vybavenia pre izotachoforézu je oveľa nižšia, než inštrumentácia pre HPLC. Ďalšou výhodou CITP je nízka spotreba chemikálií a celkovo nižšie náklady na jednu analýzu oproti HPLC a tým aj nižšie zaťaženie odpadných vôd a celkovo životného prostredia. Nevýhodou izotachoforézy je, že výsledkom separácie je sústava zón analyzovaných látok, ktoré na seba priamo nadväzujú [5, 7, 9].

HPLC je univerzálna metóda, ktorá umožňuje separáciu veľkého množstva kvapalných a tuhých látok rôznej polarity a molekulárnych hmotnosti. Na rozdiel od izotachoforézy nevýhodou HPLC je, že je potreba pred separáciou upraviť vzorku, aby došlo k zakoncentrovaniu, prečisteniu a odstránili sa z piva všetky balastné látky, ktoré môžu interferovať zo sledovanými analytmi. V tejto diplomovej práci bola na úpravu vzorku pred chromatografickou analýzou použitá metóda extrakcie na tuhú fázu SPE. Vďaka úprave vzorku sa zvýši citlivosť chromatografickej separácie, až na hladiny ppb (parts per billion) alebo ppt (parts per trillion) [8, 10, 12].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 História piva

Pivo je populárny nápoj už tisíce rokov a pivovarstvo je považované za najstarší biotechnologický proces. Archeológovia odhadujú, že prvé pivo vzniklo náhodným kvasením zrna. V 12. storočí sa ľudia domnievali, že pivo vzniklo v Egypte, ale na základe ďalších archeologických výskumov sa zistilo, že už v období 4000 až 3000 rokov pred našim letopočtom sa pivo varilo v Mezopotámii. V tomto čase sa na území medzi riekami Eufratom a Tygridom pestovalo obilie a Sumerové z neho pripravovali kvasené nápoje, podobné dnešnému pivu. Historici sa domnievajú, že na našom území to boli práve Slovania, ktorý k nám priniesli chmeľ zo svojich pravlastí. Pôvodne sa pivo varilo v každej domácnosti a neslúžilo len ako nápoj, ale pripravovali sa z neho i iné pokrmy, ako kaše a polievky. Historici uvádzajú, v 12. a 13. storočí, kláštory začali cielene pestovať chmeľ na výrobu piva. V tomto istom období začína rozvoj pivovarstva v zakladajúcich kráľovských mestách. Pre rozvoj pivovarstva v mestách bolo dôležité pridelenie práva variť pivo a míľového práva, ktoré bolo v roku 1788 zrušené. Z pivovarníctva sa stal rozvíjajúci priemysel až v stredoveku. Hlavnou oblasťou výroby sa stala stredná Európa a to hlavne Česká republika, ktorá je výhodnou oblasťou pre pestovane chmeľu a obilia. V 19. storočí vznikli priemyselné pivovary a do konca prvej polovice 19. storočia na našom území prevládala výroba vrchne kvasených pív. Spodne kvasené pivá sa vyrábali vždy hlavne v zime, kedy bol dostatok ľadu, nutného pre chladenie počas kvasenia a ležania. Druhá svetová vojna bola katastrofou českého pivovarstva a po vojne väčšina z uzavretých pivovarov už neobnovili svoju činnosť. Po roku 1989 nastala privatizácia pivovarov a veľa z nich zaniklo [4, 13].

2.2 Charakteristika piva

Pivo ako finálny výrobok pivovarského priemyslu je slabý alkoholický nápoj pripravený zo sladu, chmeľu a vody, skvasením kultúrnymi pivovarskými kvasinkami. Ako zdroj cukru sa pre pivo používa väčšinou škrob, ktorý je obsiahnutý v jačmeňom slade. Ak sa nahradzuje inou škrobnatou surovinou alebo priamo cukrom, jedná sa o surogáciu a použitá náhrada je surogát. V niektorých štátoch sa z ekonomických dôvodov používajú náhrady nákladného sladu, napr. nesladový jačmeň, ryža, kukurica, surová i rafinovaná sacharóza a ďalšie. Rozoznávame dva typy a to svetlé pivo (plzenské) a tmavé pivo (bavorské) [4, 13, 14, 15, 16].

2.3 Suroviny pre výrobu piva

2.3.1 Slad

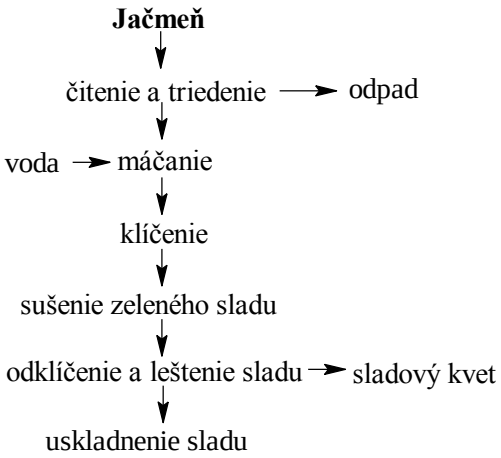
Cieľom sladovníctva je vyrobiť riadeným procesom klíčenia a hvozdenia z jačmeňa slad, obsahujúci potrebné enzýmy a aromatické i farebné látky nevyhnutné pre výrobu piva. Po klíčení jačmeňa vzniká zelený slad, následne dochádza k hvozdeniu, pri ktorom pôsobením vysokej teploty dochádza k tvorbe aromatických a farebných látok a nakoniec k premene na hotový slad. Pri nižšej teplote sušenia sa vyrábajú svetlé slady, pri zvyšovaní teploty sušiaceho vzduchu sa získajú tmavšie slady [13, 14, 15].

Pre sladovníctvo sú vhodné dvojradové odrody (*Hordeum vulgare convar. distichon*) jačmeňa siateho. Najvýhodnejší je jačmeň siaty jarný dvojradový ovisnutý (*Hordeum distichon var. nutans*), ktorého klas sa v čase zrenia skláňa k zemi a úrody sa pohybujú do 5 t/ha. Pre výrobu sladu sa využíva jačmenné zrno (obilka), ktoré sa skladá z troch častí: obal, zárodok (klíčok = embryo) a endosperm. Obalovú vrstvu tvorí plucha, pluška, oplodie a osemenie. Endosperm tvorí najväčšiu časť obilky [14, 15].

Škrob tvorí hlavný podiel sacharidovej zložky jačmeňa. Kvalitné odrody sladovníckeho jačmeňa obsahujú 62 – 65 % škrobu v sušine. Dusíkaté zložky jačmenného zrna výrazne ovplyvňujú technológiu jeho spracovania na slad i pivovarskú technológiu a kvalitu vyrobeného piva. Ďalej obsahuje jačmeň, neškrobové polysacharidy (celulózu, hemicelulózy, pentozany, β - glukany), peptidy, voľné aminokyseliny, polyfenolové látky, vitamíny, minerálne látky z ktorých sú najdôležitejšie fosforečnany [14, 15].

2.3.1.1 Výroba sladu

Prehľadné schéma výroby sladu je uvedené na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma výroby sladu [16].

1. Príjem, čistenie, triedenie a skladovanie jačmeňa

Cieľom tohto kroku je uskladniť jačmeň bez prachu a cudzích prímesi a vytriediť zrna podľa veľkosti, odrôd a kvality. Jačmeň ihneď po zbere nie je schopný klíčiť a po dobu niekoľkých týždňov fyziologicky dozrieva (dormancia jačmeňa). Hlavné faktory, ktoré ovplyvňujú podmienky skladovania, sú vlhkosť a teplota skladovaného zrna. Zrno pri skladovaní dýcha, čo je sprevádzané tvorbou oxidu uhličitého, vody a tepla. V prípade, že nie je regulovaný obsah oxidu uhličitého, prejde dýchanie v kvasenie. Produkty kvasenia narušujú a usmrcujú klíček, preto je nutné vytvoriť také podmienky skladovania, aby zrno bolo stále v prítomnosti kyslíku a metabolizmus zrna neprešiel z dýchania na kvasenie [1, 14, 15, 16, 17].

2. Máčanie jačmeňa

Cieľom máčania je zvýšenie obsahu vody v jačmeňom zrne z 12 až 15 % na 42 až 48 %. Nárast obsahu vody je dôležitý pre zahájenie enzymatických pochodov pre optimálny priebeh klíčenia a odplavenie prachu a prázdnych zŕn. Teplota vody je približne 12 °C a proces trvá

približne 72 hodín. Zrno zvyšuje svoj objem asi 1,5 - krát a s pribúdajúcim obsahom vody začína dýchať, spotrebováva kyslík a vytvára oxid uhličitý. Pri spotrebovaní kyslíku a hromadení CO_2 prechádza normálne dýchanie ku anaeróbnemu dýchaniu spojenému s kvasením a jeho metabolity (etanol) môžu poškodiť klíček. Za dostatočného prístupu vzduchu sa naopak doba máčania skracuje. Obsah škrobu a jednoduchých cukrov mierne klesá v závislosti od intenzity dýchania [1, 14, 15, 16, 17].

3. Klíčenie jačmeňa

Klíčenie je fyziologický proces, pri ktorom sa v zárodočnej časti zrna vyvíjajú zárodky korienkov a listov s využitím zásobných látok endospermu. Cieľom je aktivácia a tvorba enzýmov a dosiahnutie požadovaného stupňa rozlúštenia, teda rozštiepenia vysokomolekulárnych látok na ich štiepne produkty. Jedná sa predovšetkým o rozrušenie bunečných stien a následne o rozštiepenie škrobových zŕn a bielkovinových reťazcov. Vzniknuté nízkomolekulárne látky štiepenia sú za spolupráce enzýmov spotrebované pre výživu zárodku a pre výstavbu nových buniek – korienkov a klíčkov. Najvýznamnejšie enzýmy sú fosfatasy, cytasy, proteasy a amylasy. Fosfatasy uvoľňujú pri svojom pôsobení z fytinu a z ďalších organických látok reagujúce fosforečnany a tým napomáhajú tvorbe kyslej reakcie, ktorá je dôležitá pre činnosť ostatných enzýmov. Cytasy sú enzýmy štiepiace neškrobové polysacharidy a gumovité látky a sprístupňujú zrnká škrobu a makromolekuly bielkovín uzavreté v bunkách endospermu. Amylasy sa pri klíčení aktivujú i tvoria. Ich pôsobením sa štiepi rezervný škrob endospermu na maltózu a glukózu, ktoré sú ďalej predychávané za tvorby energie potrebnej pre životné procesy zrna. Klíčenie jačmeňa je ovplyvňované stupňom domočenia jačmeňa, teplotou a prístupom kyslíku. Vymočený jačmeň má nižší obsah vody (stupeň domočenia), než ktorý je potrebný pre priebeh klíčenia a rozlúštenia zrna. Klíčenie trvá 7 dní pri svetlom slade a 9 dní pri tmavom. Výsledkom klíčenia je zelený slad. Rozoznávame klasický spôsob klíčenia na humnách a pneumatické sladovanie. Humná sú hladké podlahy v priestorných miestnostiach s účinným vetraním. Pneumatický spôsob potlačuje nevýhody sladovania na humnách a to malú kapacitu a veľkú potrebu manuálnej práce [1, 14, 15, 16, 17].

4. Hvozdenie

Cieľom hvozdenia je znížiť obsah vody na 4 % pri svetlých sladoch a na 2 % pri tmavých sladoch. Zastaviť vegetačné procesy, redukovať časť enzýmovej aktivity a vytvoriť chuťové, farebné a oxidoredukčné látky, tvoriace charakter sladu. Zelený slad má vysoký obsah vody a nemôže sa skladovať, preto sa suší. Pri sušení sa musí postupovať tak, aby škrob nezmazovatel [1, 14, 15, 16, 17].

Hvozdenie prebieha v troch fázach: rastová, enzýmová a chemická fáza.

1. Rastová fáza - je charakteristická sušením pri teplotách do 40 °C, obsah vody je nad 20 % a zrno je schopné ďalej klíčiť.
2. Enzýmová fáza - prebieha sušenie pri teplotách 40 – 60 °C a obsah vody je pod 20 %. Dochádza k zastaveniu vegetačných procesov, ale enzýmové procesy stále prebiehajú.
3. Chemická fáza - sa vyznačuje sušením pri teplotách nad 60 °C a obsahom vody pod 10 %. Sú zastavené enzýmové reakcie a prebiehajú chemické zmeny vedúce k tvorbe chuťových a farebných látok [1, 14, 15, 16, 17].

Medzi najdôležitejšie reakcie pri hvozdení patrí tvorba chuťových, farebných a oxidoredukčných látok. Sú to Maillardove reakcie, pri ktorých dochádza k interakcii monosacharidov a aminokyselín. Najskôr vznikajú reduktony a až potom melanoidíny. Ďalšími reakciami sú karamelizácia sacharidov, enzýmová oxidácia za vzniku melanínu a neenzýmové hnednutie. Produkty týchto reakcii majú oxidoredukčné vlastnosti, zlepšujú koloidnú stabilitu a tvoria typickú farbu sladu a piva. Slad sa suší a hvozdí v zariadeniach nazývaných hvozd. Sú to lieskové sušiarne s jednou alebo dvoma lieskami. Vykurujú sa nepriamo alebo priamo spalinami [1, 14, 15, 16, 17].

4. Odklíčkovanie sladu

Po skončení procesu hvozdenia sa usušený slad zbavuje poškodených zŕn, korienkov a prachu v odklíčovačke a dopravuje sa do sila, kde musí pred ďalším spracovaním určitú dobu odležať. Pri odklíčení sa zo sladu odstraňujú korienky (sladového kvetu) a súčasne sa slad ochladzuje. Sladový kvet ma vysoký obsah biologicky významných látok, preto má ďalšie využitie v krmivárstve a fermentačných technológiách [1, 13, 14, 15, 16, 17].

2.3.2 Chmeľ

Chmeľ je dvojdomá rastlina, teda samičie a samčie kvety sú na rôznych rastlinách. K varení piva sa používajú iba samičie rastliny, ktoré musia zostať neoplodnené. Konkrétne chmeľové hlávky chmeľu európskeho (*Humulus lupulus* var. europeus) z čeľadi konopovitých (*Cannabaceae*). Čo sa týka chemického zloženia, chmeľ priemerne obsahuje: 8 - 12 % vody, 15 - 20 % celkových živíc, 2 - 6 % polyfenolových látok, 0,2 – 2,5 % silíc, 1 - 3 % voskov a lipidov, 12 - 15 % dusíkatých látok, 40 - 50 % sacharidových látok a 6 - 8 % minerálnych látok. Najdôležitejšími zložkami chmeľu sú chmeľové živice, silice a polyfenoly, ostatné zložky majú menší technologický význam. Polyfenoly sa uplatňujú v priebehu technológie pri zrážaní vysokomolekulárnych bielkovín v chmeľovare. Chmeľové silice vytvárajú charakteristické chmeľové aróma. Chmeľové živice sú nositeľom horkej chuti piva, prispievajú k tvorbe charakteristického aróma, pôsobia ako zrážacie činidlo pri vylučovaní vysokomolekulárnych dusíkatých látok mladiny, ovplyvňujú penivosť a majú baktericídny a konzervačný účinok. Chmeľové živice sa delia na α - horké kyseliny (humulon, adhumulon a kohumulon) a β - horké kyseliny (lupulon, adlupulon a kolupulon) [1, 13, 14, 15, 16, 18].

Obsah vody ovplyvňuje vlastnosti chmeľu počas skladovania. Príliš suchý chmeľ sa drobí a stráca technologicky cenné látky a naopak, chmeľ s vysokým obsahom vody je ľahko napadaný mikroorganizmami. Zozbieraný chmeľ obsahuje 72 – 82 % vody, preto sa suší pri teplote najviac 50 °C tak, aby konečná vlhkosť nepresiahla 8 %. Potom sa skladuje na pôdach, kde prijíma vzdušnú vlhkosť, čím sa zvýši obsah vody v chmeľu na 11 %. Potom sa triedi, lisuje a balí do širokých vriec (žochov). V poslednej dobe sa prírodný chmeľ nahradzuje chmeľovými výrobkami, najčastejšie extrakty. Dôvodom je jednoduchšia skladovateľnosť, vyššia stabilita chmeľových látok počas skladovania a vyššia využiteľnosť horkých látok chmeľu [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2.3.3 Voda

V pivovarníctve rozlišuje tri druhy vody podľa použitia.

1. Varná voda - sa používa pre varenie piva, ako jedna zo základných surovín,
2. Umývacia a sterilizačná voda,
3. Prevádzková voda - ktorá sa používa pre účely chladenia, umývania a podobne.

Voda má veľký vplyv na charakter a kvalitu piva. Pri výrobe sa spotrebuje asi 12 - násobok vody na vyrobené množstvo piva. Varná voda tvorí malú časť s celkovej spotreby vody. Najväčšia časť sa spotrebuje k máčaniu jačmeňa a v pivovaroch k umývaniu, čisteniu a na chladenie v kotloch [1, 13, 14, 15, 16, 18].

Voda v prírode predstavuje veľmi zriedený roztok solí a ďalej obsahuje rozpustené plyny, prípadne suspendované organické a anorganické látky. Rozdeľujeme ju na spodnú vodu a povrchovú vodu. Spodná voda sa získava zo studní alebo prameňov. Voda z týchto zdrojov má vyšší obsah iónov a rozpustených plynov a nižší obsah mikroorganizmov. Povrchová voda je z riek, jazier, priehrad a rybníkov. Táto voda obsahuje častice nerozpustených zemín, organické a anorganické látky a mikroorganizmy [1, 13, 14, 15, 16, 18].

Dôležitý kritériom posudzovania kvality vody pre pivovarský priemysel je jej tvrdosť. Je tvorená obsahom iónov kovu alkalických zemín, hlavne vápniku a horčíku. Rozoznávame tvrdosť stálu neuhličitanovú, nekarbonovú a prechodnú karbonovú, uhličitanovú. Tvrdosť stála je tvorená vápenatými a horečnatými soľami, ktoré sú stále (sírany, chloridy, kremičitany). Tvrdosť prechodná je tvorená hydrogenuhličitany vápniku a horčíku, ktoré sa varom úplne alebo čiastočne rozkladajú. Z pivovarského hľadiska majú význam reakcie iónov vápniku a horčíku s fosforečnany sladu, ktoré spôsobujú zníženie pH, teda zvyšujú kyslosť rmutu, sladiny a mladiny a to pôsobí pozitívne na činnosť enzýmov pri rmutovaní. Na druhej strane hydrogénuhličitanové a uhličitanové ióny pôsobia opačne, zvyšujú pH, teda znižujú kyslosť a pôsobia negatívne na varný proces. Pre výrobu svetlých pív je vhodná mäkká voda s menším podielom horčíku a prechodnou tvrdosťou. Pre tmavé piva nevadí i tvrdšia voda. Varná voda nemá zásadne obsahovať alkalické uhličitany, chlór, príliš železa, mangánu a dusičnanov. Zvýšené nároky na chemické zloženie varných vôd vyžadujú často úpravu pitnej vody. Medzi najčastejšie úpravy patrí dekarbonizácia a odsoľovanie. Dekarbonizáciou sa odstraňuje prechodná karbonátová tvrdosť, vyzrážaním Ca^{2+} a Mg^{2+} vo forme nerozpustných uhličitanov. Na odsoľovanie sa používa reverzná osmóza [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2.3.4 Pivovarské kvasinky

Pivovarské kvasinky sú kultúrne mikroorganizmy rodu *Saccharomyces* používané k produkcii spodne a vrchne kvasených pív. Zdrojom kvasiniek pre prípravu novej kultúry môže byť prevádzková kvasiaca mladina v štádiu bielych krúžkov v druhom alebo treťom nasadení, alebo banka kvasničných kmeňov.

Rozoznávame dva druhy pivovarských kvasníc:

1. *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* (kvasinky vrchného kvasenia) - kvasia pri vyšších teplotách v rozsahu 15 - 23 °C a pri teplote 10 °C kvasenie ustáva. Po ukončení kvasenia sú vynášané na hladinu vznikajúcim oxidom uhličitým, kde tvoria tzv. deku.

Majú vyššiu tepelnú odolnosť a používajú sa hlavne na výrobu pšeničných pív. Rafinózu skvasujú iba z jednej tretiny a majú vyššiu schopnosť sporulácie,

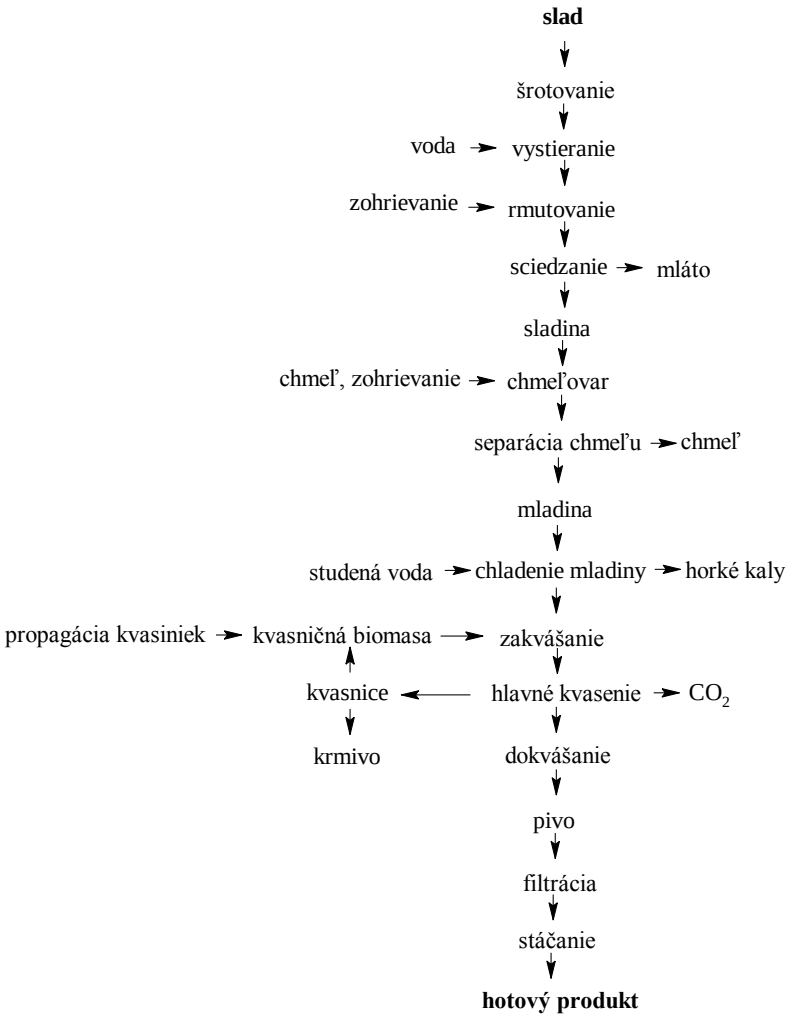
2. *Saccharomyces* subsp. *uvarum* (kvasinky spodného kvasenia) – kvasenie prebieha pri teplotách 6 – 14 °C. Po ukončení kvasného procesu usadajú na dno kvasných nádob. Používajú sa pre pivá plzenského typu. Úplne skvasujú rafinózu a majú nižšiu schopnosť sporulácie.

Kvasinky spodného a vrchného kvasenia sa ďalej odlišujú, rozdielnym zložením genetického materiálu a tvorbou senzoricky významných látok [1, 13, 18].

2.4 Výroba piva

Výroba piva sa delí na 3 výrobné časti a je prehľadne zobrazená na Obr. 2:

1. Výroba mladiny zo sladu, chmeľu a vody (horúca fáza).
2. Kvasenie mladiny a dokvasovanie mladého piva pivovarskými kvasinkami (studená fáza).
3. Záverečné úpravy a stáčanie zrelého piva do transportných nádob alebo obalov (studená fáza) [14, 15].



Obr. 2: Schéma výroby piva [16].

2.4.1 Výroba mladiny

Cieľom výroby mladiny je previesť do roztoku extraktívne látky sladu a chmeľu v optimálnom množstve a zložení a zabezpečiť tak dostatok živín pre metabolizmus kvasiniek a primeranú horkosť piva [16].

Výroba mladiny pozostáva z nasledujúcich technologických úsekov:

1. Šrotovanie sladu,
2. Vystieranie sladového šrotu do vody,
3. Rmutovanie,
4. Sciedzanie sladiny a vyslazovanie sladového mláta,
5. Chmeľovar a chladenie mladiny [14, 15].

2.4.1.1 Šrotovanie

Slad je uložený v silách a pred mletím sa musí ešte prečistiť, odstrániť z neho kovové prímesi a zvážiť. Cieľom šrotovania je dokonalé vymletie endospermu sladových zŕn na vhodný pomer častíc, pri zachovaní celistvosti obalových pluch. Šrotovanie je mechanický proces rozrušenia zrna, potrebný pre sprístupnenie extraktívnych látok sladu a urýchlenie ich rozpustenia. Rozdrvením zrna sa sprístupní endosperm pre fyzikálne, chemické a enzýmové reakcie vo varne pri výrobe mladiny. Endosperm sladu musí byť veľmi jemne rozomletý, pretože sa z neho získava základný podiel extraktu mladiny. Pluchy majú funkciu prirodzenej filtračnej vrstvy, preto by mali zostať celistvé. Okrem toho obsahujú polyfenolové horké a farebné látky, ktoré by pri jemnom mletí prešli do mladiny a nepriaznivo ovplyvnili chuť, farbu a koloidnú stabilitu piva.

Typy šrotovania:

1. Za sucha,
2. Za sucha s oddelením jednotlivých frakcii,
3. S predbežne navlhčenými pluchami vodou alebo parou,
4. Za mokra.

Pri mletí sladu za sucha sa používajú dvojvalcové až šesťvalcové šrotovníky. Mokré šrotovanie umožňuje lepšiu celistvosť plúch pri rozomletí endospermu. Slad sa pred mletím máča vo vode dovtedy, kým sa nedosiahne asi 30 % obsah vody. Táto voda sa potom použije na vystieranie [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.2 Vystieranie

Cieľom vystierania je dobre zmiešať sladový šrot s nálevom varnej vody. Prevod látok do roztoku pri vystieraní ovplyvní celý ďalší proces výroby piva a jeho kvalitu. Množstvo rozpustených látok závisí na množstve a zložení použitých surovín na várku a na objeme vody v hlavnom nálevu. Pre svetlé pivá sa volí väčší nálev, aby sa získal redší rmut. Tým sa zabezpečí pri rmutovaní urýchlenie enzýmovej reakcie, podporuje sa činnosť amylolytických enzýmov a tým i rýchlejšie scukernenie sladiny. Pre tmavé piva sa volí menšie množstvo nálevu a získa sa hustý rmut, ktorý zabezpečí dlhšiu dobu pôsobenia proteolytických enzýmov.

Vystieranie môže prebiehať za studena (teplota vody do 20 °C) alebo za tepla (teplota vody 35 – 38 °C). Pri oboch typoch vystierania je hlavný nálev vody rozdelený na dva podiely.

Postup vystierania prebieha nasledovne:

1. Na začiatku vystierania sa zmieša sladový šrot s prvým podielom nálevu.
2. Potom sa primieša ako druhý podiel nálevu horúca voda, ktorou sa prevedie zaparenie.
3. Následný nálev je voda potrebná pre vylúhovanie mláta v priebehu scezovania a pre nariedenie predku na požadovanú koncentráciu mladiny [13, 14, 15, 18].

2.4.1.3 Rmutovanie

Cieľom rmutovania je rozštiepenie a prevedenie optimálneho podielu extraktu surovín do roztoku. Pri tomto procese prebiehajú mechanické, chemické, fyzikálne a enzýmové deje. Rozhodujúca je činnosť amylolytických, proteolytickyých a kyselinotvorných enzýmov. Pôsobením proteolytických enzýmov dochádza k štiepeniu dusíkatých látok. Najvýznamnejší proces rmutovania je štiepenie škrobu na zkvasniteľné sacharidy (maltózu a glukózu) pôsobením amylolytických enzýmov.

Škrob sa štiepi v štyroch etapách:

1. Zvyšovaním teploty, škrobové zrná obsiahnuté v rozomletom slade, začnú napučiavať.
2. Mazovatenie škrobu nastáva pri teplote 52 °C.
3. Stekutenie škrobu účinkom α - amylázy, optimálna teplota stekutenia je 65 – 70 °C a pH 4,6.
4. Scukernenie škrobu nastáva pri teplote 72 – 75 °C. Je to výsledkom hydrolyického pôsobenia α – amylázy a β – amylázy. Komplex amyláz štiepi škrob za tvorby rôznych podielov jednotlivých cukrov vo výslednej sladine: maltózy, hexózy, sacharózy, nižšie dextríny a vyššie dextríny. Nad 65 °C sa začne inaktivovať β – amyláza a pri 80 °C α – amyláza [13, 14, 15, 16, 18].

Existujú dva typy rmutovania, dekokčný a infuzný spôsob. Infuzný spôsob je najjednoduchší spôsob a prevádza sa iba v jednej vyhrievanej nádobe. Infúzny postup zabezpečuje rozpúšťanie a štiepenie extraktu sladu s dlhodobejším účinkom sladových enzýmov, bez účasti mechanického vplyvu povarenia rmutu. Dekokčné rmutovanie je založené na postupnom spúšťaní čiastkových rmutov z vystretého diela do panvy, kde sa scukorňujú a varia. Po vrátení do nádoby s hlavnou časťou diela sa dosiahne potrebné zvyšovanie teplôt. Podľa počtu čiastkových rmutov rozoznávame postupy na jeden, dva, tri rmuty [13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.4 Sciedzanie sladiny

Po skončení rmutovania sa musí vzniknuté dielo, teda hustá suspenzia mláta vo vodnom roztoku extraktívnych látok (sladine), dokonalo rozdeliť na dve fáze, kvapalnú fázu tzv. sladinu, a pevnú fázu, tzv. mláto. Tento proces sa uskutočňuje v sciedzacej nádrži, kde sa sladina oddeľuje od mláta prirodzenou filtráciou, cez vrstvu sedimentovaných pluch a ostatných nerozpustených zvyškov sladu. Prefiltrovaný roztok extraktu sladu sa nazýva predok. Po skončení stekania predku obsahuje mláto ešte veľa extraktu (cukru) a preto je nutné ho

vylúhovať, tzv. preliať horúcou vodou, čím sa získa zriedená sladina, takzvané výstrelky. Postup vylúhovania sa opakuje, až sa dosiahne stupňovitosť 1 % [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.5 Výroba mladiny (Chmeľovar)

Cieľom chmeľovaru je skoncentrovanie a sterilizácia mladiny, prevedenie horkých látok chmeľu do mladiny, inaktivácia enzýmov a koagulácia bielkovín s polyfenolovými látkami sladu a chmeľu. Hlavnými reakciami sú izomeračné reakcie α - horkých kyselín, pri ktorých vznikajú intenzívne horké produkty nazývané iso - α - horké kyseliny. Ďalej prebiehajú Maillardove reakcie s tvorbou farebných a aromatických látok s oxidoredukčnými vlastnosťami a denaturácia sladových bielkovín. Pri chmeľovare dochádza k fyzikálne – chemickým zmenám, ktoré stabilizujú koncentráciu a zloženie mladiny.

Postup výroby mladiny:

a) Scezená sladina spolu s výstrelky sa zmieša v mladinovej pánvy.
b) Sacharometrom sa zmeria celková stupňovitosť a začne sa variť.
c) Počas varu sa pridáva chmeľový granulát v kombinácii s chmeľovým extraktom.
d) Výsledným produktom povarenia chmeľu zo sladinou je horúca mladina.
e) Tento proces trvá približne 90 – 120 minút [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.6 Chladenie mladiny a separácia hrubých kalov

Mladina po chemľovare obsahuje hrubé kaly, ktoré je nutné odstrániť, pretože by pri kvasení spôsobovali problémy. Na chladenie a separáciu sa používajú vírivé, usadzovacie nádrže, odstredivky alebo dekantéry. Vírivá nádrž je valcová nádoba, kde sa horúca mladina privádza tangenciálne vysokou rýchlosťou. Mladina v nádrži rotuje a hrubé kaly sedimentujú v strede vírivej nádrže, kde sa ukladajú vo forme koláča. Po zastavení sa mladina odčerpáva otvormi v nádrži do chladiča. Mladina sa musí pred zakvasením schladiť na teplotu zákvasu cca 6 °C a sýtiť za sterilných podmienok kyslíkom, ktorý je nevyhnutný pre činnosť kvasiniek. Schladenú a prevzdušnenú mladinu je nutné, čo najskôr skvasiť kultúrnymi kvasnicami, aby nedochádzalo k pomnožovaniu rôznych mikroorganizmov [13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.7 Kvasenie mladiny

Kvasenie mladiny za vzniku piva, prebieha v dvoch stupňoch. V prvom stupni prebieha hlavné kvasenie a v druhom stupni prebieha dokvasenie a ležanie piva.

1. Hlavné kvasenie

Cieľom hlavného kvasenia je neúplne skvasenie cukornatých látok extraktu mladiny pivovarskými kvasinkami. Produktami sú etanol, oxid uhličitý, vedľajšie metabolity významné pre buket piva a súčasne dochádza k pomnoženiu kvasničného zákvasu. Podľa druhu použitých kmeňov kvasiniek a teploty kvasenia, prebieha buď spodné, alebo vrchné kvasenie. S kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae*, prebieha vrchné kvasenie pri teplotách 15 - 23 °C. Po ukončení kvasenia sú vyplavované do deky na hladinu kvasného média. Spodné kvasenie prebieha pri teplotách 6 – 14 °C s kvasinkami *Saccharomyces* subsp. *uvarum*, ktoré po skončení kvasenia sadajú na dno kvasných nádob [13, 14, 15, 16, 18].

Hlavné kvasenie piva má tieto štádia:

1. Po 12 h po zakvasení mladiny nastáva zaprašovanie pri ktorom sa uvoľňuje CO_2 a vytvára na povrchu mladiny penu. Postupne sa pena sťahuje do stredu kvasnej nádoby.
2. Druhé štádium hlavného kvasenia nastáva za 36 hodín a trvá 2 – 3 dni. Je charakteristické tvorbou nízkych a vysokých bielych krúžkov peny. Je to obdobie najintenzívnejšej činnosti kvasníc. Rozmnožovanie kvasníc v tomto štádiu sa zastavuje nedostatkom kyslíku a čiastočne prítomnosťou alkoholu a oxidu uhličitého, čo sú vlastné metabolity kvasníc. V tomto štádiu dochádza k maximálnemu vývinu CO_2 a poklesu pH piva na 4,7 - 4,9.
3. Vysoké hnedé krúžky trvajú približne 3 dni a spôsobujú ich vyzrážané kaly vynesené do peny.
4. Posledné štvrté štádium hlavného kvasenia je premena mladiny na mladé pivo. Nastáva prepadávanie deky, teda sedimentácia kvasníc. Deka sa však musí zavčasu zobrať, pretože obsahuje mŕtve kvasinky, polyfenoly a vysokomolekulárne dusíkaté látky. Mladé pivo je pripravené na sudovanie [13, 14, 15, 16, 18].

2. Dokvasenie a zrenie piva

Druhá fáza fermentácie sa nazýva dokvasenie a ležanie piva. Cieľom dokvasenia a zrenia (ležania) piva je pomalé skvasovanie sacharidov, sýtenie a fixácia oxidu uhličitého zo súčasným vyčírením a zaistením organoleptickej zrelosti piva. Zrenie chuti a vône piva je spôsobené zmenou zloženia koloidných a prchavých látok. Prirodzené čírenie nastáva vylučovaním vysokomolekulárnych látok z roztoku. Počas druhej fáze fermentácie prebieha rada zmien pôvodného zloženia zeleného sudového piva a to v závislosti na teplote, tlaku, dobe dokvasovania, zrenia, na fyzikálne – chemickom stave zeleného piva a vlastnostiach použitého kmeňa kvasiniek. Dokvasovanie a zrenie piva prebieha v dozrievacích tankoch pri nízkej teplote 0 – 3°C a miernom pretlaku [13, 14, 15, 16, 18].

2.4.1.8 Záverečné úpravy piva

Medzi záverečné úpravy piva patrí filtrácia, pasterizácia prípadne stabilizácia. Na koniec sa pivo stáča do transportných obalov.

1. Filtrácia

Filtrácia je proces, pri ktorom sa odstraňujú kalové látky, dosahuje sa vyžadovaná čírosť a zvyšuje sa biologická a koloidná trvanlivosť. Čírosť a vysoká stabilita piva sú základné požiadavky spotrebiteľa na kvalitu výrobku. Musí sa dbať na to, aby filtrácia neznižovala penivosť piva, nedodávala do piva kyslík, ióny kovov katalyzujúce oxidačné reakcie pri skladovaní, ani ďalšie zlúčeniny, ktoré by negatívne ovplyvnili chemické zloženie a organoleptické vlastnosti piva.

Filtračné materiály rozdeľujeme do 3 skupín:

1. Vláknité: pivovarská hmota, syntetické tkaniny,

2. Zrnité a práškovité: kremeliny, perlity, kombinované materiály s celulózovými vláknami, silikagély, aktívne uhlie,
3. Pórovité: membrány z plastu, kovu alebo keramiky.

Najmodernejším a najnákladnejším spôsobom je membránová filtrácia [1, 13, 14, 15, 16, 18].

2. Pasterizácia

Cieľom pasterizácia je zabezpečiť dlhodobú biologickú trvanlivosť (stabilitu) piva a odstrániť prekurzory biologického zákalu piva, predovšetkým vysokomolekulárne dusíkaté látky, polyfenoly, kovovové ióny a rozpustený kyslík.

Používajú sa tieto druhy stabilizátorov:

1. Zrážacie – tanin,
2. Adsorpčné – silikagel,
3. Enzýmové – papain,
4. Antioxidačné - kyselina askorbová.

Stabilizátory sa do piva pridávajú najčastejšie pred koncom dokvasení, aby sa prípadné vylúčené látky odstránili filtráciou. Pasterizácia je tepelná inaktivácia mikroorganizmov spôsobujúcich kazenie piva. Na rozdiel od sterilizácie, ktorá tepelne inaktivuje všetky mikroorganizmy. V praxi sa používajú dva typy pasterizácie: tunelová a prietoková pasterizácia. Alternatívou prietokovej pasterizácie je membránová filtrácia, teda sterilizácia za studena. Rozdiely medzi tunelovou a prietokovou pasterizáciou zhrňuje Tab. 1 [1, 14, 15, 16, 18].

Tab. 1: Výhody a nevýhody prietokovej pasterizácie [*18*].

Prietoková pasterizácia	
Výhody	**Nevýhody**
Menšie narušenie organoleptických vlastnosti piva	Nutnosť dokonalej sterility zariadenia
Nižšia spotreba energie	Menšia spoľahlivosť mikrobiologickej stability
Nižšie nároky na priestor	Nutnosť plnenia piva za studena
Nižšia cena	Ťažšie udržanie čistoty

3. Stáčanie do transportných obalov

Poslednou fázou výroby je stáčanie piva do transportných obalov. Cieľom stáčania piva je preliať dokvasené, chuťovo vyzreté a odfiltrované pivo do transportných nádob s minimálnymi stratami oxidu uhličitého a zmenami v kvalite piva. Za týmto účelom sú stáčacie zariadenia konštruované na izobarickom princípe. V neposlednej rade je nutné zamedziť kontaktu piva s kyslíkom a preto sa pivo stáča pod tlakom oxidu uhličitého do obalov preplnených oxidom

uhličitým. Ďalej je nutné zaistiť dokonalú sanitáciu všetkých zariadení, ktoré prichádzajú do styku s pivom [1, 14, 15, 16, 18].

4. Hotové pivo

U nás sa vyrábajú hlavne svetlé pivá a podľa koncentrácii mladiny sa rozlišujú pivá výčapné, teda konzumné (do 10,5 %), ležáky (do 12,5 %) a pivá špeciálne (nad 12,5 %). Zvláštnym typom sú pivá so zníženým alebo nulovým obsahom alkoholu. Tento druh piva je vyrábaný buď potlačením kvasenia z nízkoprocentných mladín alebo odstránením alkoholu z bežne vyrobeného piva [14, 15].

2.5 Látky prítomné v pive

Pivo pozostáva z viac než 800 zlúčenín a mnoho z nich prispieva k chuťoým a vonným charakteristikám. Závisí to na množstve chloridov, síranov, uhličitanov a horčíku. Železo, olovo, meď, zinok, cín a všetky ich formy sú naopak negatívne a môžu byť príčinou tvorby zákalu v pive. Medzi anorganické a organické anióny stanovované v pive patria chlorid, sulfát, fosfát, oxalát, formát, malát, citrát, sukcinát, pyruvát, acetát, laktát a pyroglutamát. Metódy stanovenia anorganických a organických aniónov sú IC, HPLC analýza, CE a CZE s vodivostnou detekciou v sérii s UV detekciou pri 254 nm [4, 5].

2.6 Organické kyseliny

Organické kyseliny sú významné zložky predovšetkým produktov rastlinného pôvodu. Sú medziprodukty alebo hlavné produkty metabolických procesov kvasiniek v priebehu alkoholového kvasenia s výnimkou kyseliny octovej, ktorá je metabolitom baktérií. Majú vplyv na priebeh chemických a enzýmových reakcií, organoleptické i technologické vlastnosti a mikrobiologickú stabilitu potravín počas skladovania a spracovania. Ako vonné a chuťové látky sa uplatňujú hlavne nižšie karboxylové kyseliny a niektoré aromatické kyseliny. Z alifatických kyselín je to kyselina octová a kyselina mliečna, ktoré sú významnými nositeľmi kyslej chuti potravín. Vlastnosti vybraných organických kyselín uvádza Tab. 2 [19, 20].

Molekuly organických látok môžu niesť záporný náboj v dôsledku disociácie (nitrofenoly, kyselina benzoová) alebo kladný náboj v dôsledku protonizácie (anilín, tyramín) [6, 8].

Medzi organické kyseliny, ktoré sa najčastejšie stanovujú v pive patria: kyselina citrónová, jablčná, jantárová, mliečna, octová, šťaveľová a ich obsahy uvádza Tab. 3 [3].

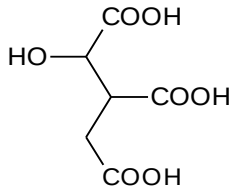
Tab. 2: Vlastnosti niektorých organických kyselín [20].

Názov kyseliny	Sumárny vzorec	Molekulová hmotnosť	pK	Chuť
jablčná	$C_4H_6O_5$	134,1	3,4	Ostrá kyslá
mliečna	$C_3H_6O_3$	90,08	3,8	Jemná kyslá
citrónová	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	192,1	3,1	Kyslá
jantárová	C_4H_6O4	118,1	4,2	Horko - slaná
octová	$C_2H_4O_2$	60,05	4,8	Štipľavá, kyslá, dráždivá

Tab. 3: Obsah vybraných organických kyselín v pive [19].

Názov kyseliny	Obsah v [mg·dm^{-3}]
jantárová	5 – 166
L - mliečna	2 – 362
D - mliečna	0 – 372
L - jablčná	0 – 213
citrónová	5 – 262
octová	12 – 155

2.6.1 Kyselina citrónová



štruktúrny vzorec kyseliny citrónovej

Citrónová kyselina je najvýznamnejším zástupcom trikarboxylových hydroxykyselín. Jej druhý názov je hydroxytrikarboxylová. Nachádza sa v citrónoch, brusinkách, ríbezlích, ostružinách, jahodách. Vo forme svojich solí ako citran vápenantý sa nachádza v cukrovej repe a ako citran sodný, draselný a vápenatý sa nachádza v mlieku. V kryštalickej podobe bola prvý krát izolovaná z citrónovej šťavy Scheelem v roku 1784. Veľmi dlhú dobu boli citróny jediných zdrojom pre výrobu kyseliny citrónovej. Táto výroba spočívala v tom, že sa citrónová šťava nechala zakvasiť a zrelý kvas sa neutralizoval roztokom hydroxidu vápenatého. Vzniknutý citran vápenatý sa izoloval a kyselina citrónová sa z neho uvoľnila kyselinou sírovou. Dnes sa kyselina citrónova vyrába kvasením. Pri povrchovom i submerznom spôsobe kvasenia sa používa *Aspergillus niger,* ale sú toho schopné i iné druhy plesní rodu *Aspergillus* a *Penicilium* [3].

Kyselina citronová nie je odolná voči bakteriálnemu napadaniu, ktoré ju po čase môžu premeniť na iné produkty napr. kyselinu octovú, kyselinu mliečnu, aceton, butandiol [20].

Prekurzory kyseliny citrónovej sú kyselina oxaloctová a octová. Význam kyseliny octovej spočíva v tom že kondenzáciou 2 molekúl kyseliny octovej vzniká kyselina jantárová, ktorá je potom premeniteľná v prekurzor kyseliny citrónovej, kyselinu C4 - dikarboxylovú. Táto kondenzácia je známa ako Thunberg - Wielandova reakce [3].

Kyselina citrónová, môže byť vytváraná pri metabolickom štiepení sacharidov, aminokyselín a mastných kyselín [20].

2.6.1.1 Použitie kyseliny citrónovej

Najväčšie množstvo sa spotrebuje pre lekárske účely, v potravinárstve (prášky do pečiva, limonády, kandované ovocie, zemiaky), ďalej ako prísada do farby v tlačiarenskom priemysle a pre prípravu esterov. Citrónová a jablčná kyselina sa pridávajú bežne ako prísada do

konzervárenských výrobkov, nealkoholických nápojov, kde plnia funkciu acidulantu, ale tiež slúžia k deodorácií olejov [3, 19].

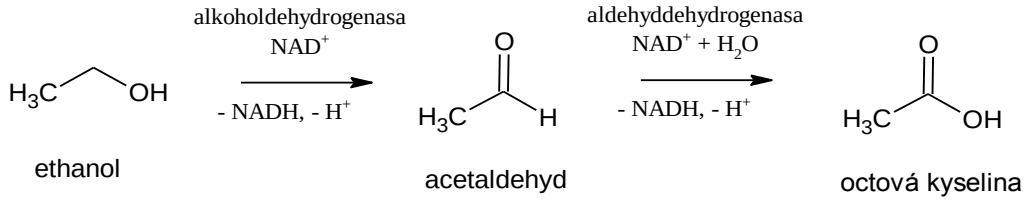
2.6.2 Kyselina octová

Kyselina octová je najbežnejšou monokarboxylovou kyselinou vyskytujúcou sa v potravinách. Je zložkou ovocia (voľná kyselina a jej estery) a potravín. Vzniká ako produkt degradácie cukrov a iných zložiek potravín pri termických procesoch. Pre potravinársky priemysel sa vyrába z etanolu alebo ovocných vín alebo moštov ako kvasný liehový alebo ovocný ocot. Jedná sa o mikrobiálnu oxidáciu aeróbnymi baktériami rodu *Acetobacter*. Pri kvasení vín býva výsledná koncentrácia octovej kyseliny okolo 5 %, pri kvasení zriedených roztokov etanolu 12 – 14 % [20].

Výroba kyseliny octovej oxidáciou etanolu je dehydrogenačný proces podmienený cytochromovým systémom [3].

Postup premeny etanolu na kyselinu octovú má nasledujúce kroky a je uvedená na Obr. 3:

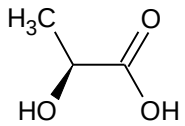
1. Tvorba acetaldehydu ako medziproduktu,
2. Hydratácia acetaldehydu,
3. Tvorba kyseliny octovej,
4. Prenos elektrónov.



Obr. 3: Premena etanolu na kyselinu octovú [3].

Prítomnosť kyseliny octovej v alkoholických nápojoch poukazuje na bakteriálnu aktivitu. Kyselina octová sa hromadí v mladine v lag fázi na začiatku fermentácie a je potom opakovane utilizovaná, tak že koncentrácia klesne na nízku hodnotu. Spotrebovanie pyruvatu pekarskými kvasinkami vedie k hromadeniu kyseliny octovej. To ukazuje na to, že hladina pyruvatu v pive sa nemení v neprítomnosti kvasiniek [2].

2.6.3 Kyselina mliečna



štruktúrny vzorec kyseliny mliečnej

Kyselina mliečna patrí medzi hydroxykyseliny a jej druhý názov je 2 - hydroxypropánová. Hydroxykyseliny sú neprchavé polárne látky a ako vonné látky sa v potravinách veľmi neuplatňujú. Niektoré hyxdroxykyseliny sú však najvýznamnejšími nositeľmi chuti ovocia, zeleniny a ďalších potravín [19].

Výroba kyseliny mliečnej bola objavená už v roku 1780 švédskym chemikom Scheelem v kyslom mlieku a prevádzkovo sa začala pripravovať v roku 1881 v USA. Dnes je výroba založená na fermentácii v diskontinuálnych fermentoroch s provozním kmeňom *Lactobacillus delbrückii* s dostatočnou aktivitou v teplotnom optime pri 45 - 48 °C, ktoré zaručene zamedzí rozvoji bežnej kontaminácie [1].

V prírode prebieha samovoľne mliečne kvasenie, ktoré sa používa ku konzervovaniu uhoriek, kapusty, siláži, v mliekarstve pri príprave kyslého tvarohu a syrov. Baktérie ktoré majú schopnosť tvoriť kyselinu mliečnu nazývame mliečne baktérie. Rozdeľujeme ich na homofermentatívne a heterofermentatívne. Kyselina mliečna je konečným a hlavným produktom homofermentatívnych baktérii mliečneho kvasenia. Vyrába sa kvasením cukrov alebo scukorneného škrobu, u nás sa používa melasa. Hlavné homofermentatívne rody baktérií sú *Pediococcus sp.*. Homofermentatívny proces poskytuje dve molekuly ATP na jednu spotrebovanú glukózu. Heterofermentatívne baktérie, okrem kyseliny mliečnej produkujú ešte prchavé kyseliny, CO_2, prípadne etanol a glycerol. Mechanizmus tvorby konečných produktov u heterofermentatívnych mliečnych baktérii je rôzny, podľa druhu mikroorganizmu. Hlavné heterofermentatívne baktérie sú *Lactobacillus sp.* alebo *Oenococcus oeni*. Heterofermentatívny proces poskytuje iba 1 molekulu ATP [3, 20].

2.6.3.1 Formy kyseliny mliečnej

Kyselina mliečna ma asymetrický uhlík a vyskytuje sa v 3 formách:
aktívna D -, L - forma a DL - neaktívna forma.

a. Aktívna D -, teda L - (+) kyselina mliečna (S) - 2-hydroxypropanová je produkovaná *L. casei, L. Helveticus.,* je obecne produkovaná homofermentatívnymi baktériami, napríklad v kyslej smotane alebo vo vnútornostiach. Heterofermentatívnym mliečnym kvasením sa vyskytuje v kyslej kapuste, kyslých uhorkách, olivách,
b. Aktívnu L -, teda D - (-) kyselinu mliečnu produkujú *L. caucasius, L. lactii,*
c. Neaktívna DL forma, ktorú produkuje *L. plantarum.*

Obchodná kyselina mliečna je iba neaktívnou racemickou formou. Kyselinu mliečnu z cukru produkujú aj niektoré druhy plesní. Hlavne z čeľadi *Mucoraceae, Blastoclodiama Monilia, Rhizopus*. Okrem kyseliny mliečnej je vo väčšine prípadov tvorená i kyselina fumarová, mravenčia, octová, malonová, jantárová a etanol [3, 19].

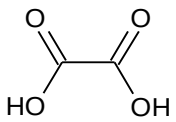
Chemickou cestou sa dá vyrobiť kyselina mliečna kondenzáciou acetaldehydu, oxidu uhoľnatého a vodnej pary. Použije sa tlaku 500 atm. a teploty 150 °C za použitia bortrifluoridu ako katalyzátoru [3].

2.6.3.2 Použitie kyseliny mliečnej

Kyselina mliečna má dve aktívne skupiny OH, jednu v karboxyle, druhú v polohe alfa. Tvorí teda rôzne soli, ethery, estery a rôzne kombinácie týchto derivátov. Používa sa v potravinárskom priemysle pri výrobe štiav, limonád, šumiacich práškov, kyslých uhoriek, zmrzliny i rôznych pokrmov. Ďalej sa kyselina mliečna používa v poľnohospodárstve, pivovarstve, liehovarstve, konzervárenstve a tiež má široké využitie v chemickom priemysle [3].

Hlavná a najčastejšie prítomná organická kyselina v pive. Kyselina mliečna sa tvorí počas utilizácie cukru. Počas fermentácie hodnota D - kyseliny mliečnej rastie a hladina L - kyseliny mliečnej sa nemení a zostáva konštantná. K biologickému okyselovaniu rmutov a sladiny sa používa kyselý rmut obsahujúci kyselinu mliečnu produkovanú mliečnymi baktériami. Kyselina mliečna má vplyv na pH sladu, L - forma kyseliny mliečnej vzniká v rámci anaerobnej respirácie jačmenného zrna a D – forma vzniká v rámci metabolizmus kontaminujúcich mikroorganizmov. Preto je potrebné, úpravy za účelom zvyšovania acidity kyselinou mliečnou zjednotiť z dokonalým udržovaním čistoty počas skladovania [1, 2, 17] .

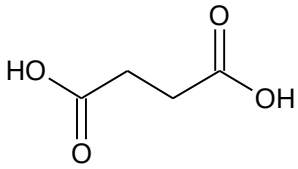
2.6.4 Kyselina šťaveľová



štruktúrny vzorec kyseliny šťaveľovej

Šťaveľová kyselina je základná alifatická dikarboxylová kyselina. Je rozpustná v kyslom a nerozpustná v neutrálnom a alkalickom prostredí. Patrí medzi antinutričné látky, pretože tak interferuje s metabolizmom vápniku. Jej druhý názov je oxalová kyselina a jej hlavným prekurzorom je L - askorbová kyselina. Je bežnou zložkou ovocia a zeleniny, kde sa vyskytuje napríklad ako rozpustná draselná soľ v banánoch alebo ako vápenatá soľ v nezrelom ovocí a zelenine. Tvorí prirodzenú súčasť rastlín a húb a v pivovarstve pochádza predovšetkým z jačmenného sladu. Pri zvýšenom obsahu vápniku sa vylúči nadbytočný šťaveľan vápenatý, ktorý môže v pive spôsobovať gushing alebo zákaly. Riadeným prídavkom vápenatých solí sa šťaveľan vápenatý vylúči už v predchádzajúcich fázach výroby. Taktiež studené a dlhé dokvašovanie môže vyzrážať šťavelan vápenatý už vo fázy ležania piva. Stanovenie kyseliny šťavelovej v sladu a pive využíva postupy zrážania, spektrofotometrie, plynovej chromatografie, enzýmových metód a v neposlednej rade izotachoforézy. Množstvo kyseliny šťaveľovej v hotovom pive sa pohybuje medzi 5 až 30 mg/l [18, 19].

2.6.5 Kyselina jantárová

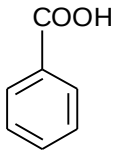


štruktúrny vzorec kyseliny jantárovej

Jantárová kyselina patrí medzi nasýtené alifatické dikarboxylové kyseliny. Je medziproduktom biosyntézy mastných kyselín, citrátového cyklu aj metabolických pochodov. Nachádza sa v niektorých druhoch ovocia ako sú jahody a ríbezle [19].

Kyselina jantarová je menej vyskytujúcou sa kyselinou v pive. Najviac sa tvorí pri fermentácii mladiny [2].

2.6.6 Kyselina benzoová



štruktúrny vzorec kyseliny benzoovej

Kyselina benzoová je bezfarebná až biela kryštalická látka bez zápachu alebo s veľmi slabou charakteristickou vôňou. Je najjednoduchšia aromatická karboxylová kyselina, málo rozpustná vo vode, rozpustná vo vriacej vode a veľmi ľahko rozpustná vo väčšine organických rozpúšťadiel. Slúži ako medziprodukt pri biosyntéze mnoho sekundárnych metabolitov a je prirodzene prítomná buď, voľne alebo viazaná ako estery kyseliny benzoovej. Nachádza sa v mnohých prírodných produktov ako sú napríklad brusnice, klinčeky, škorica, slivky, syry a ďalšie [20, 21, 22].

Kyselina benzoová a jej soli (E 210 – E 213) patria medzi najdôležitejšie konzervačné látky a sú účinným inhibítorom kvasiniek, plesní a niektorých baktérii. Účinnosť kyseliny benzoovej a jej solí je závislá na pH v potravinách. Kyselina benzoová je pomerne slabá, preto nevyžaduje príliš kyslé prostredie, ale pre vyslovene nekyslé potraviny sa nehodí. Hodí sa hlavne ku konzervácii potravín, ktorých pH je menšie ako 4. Príkladom takýchto potravín sú ovocné džúsy a iné nealkoholické nápoje, sirupy, marmelády, sušené ovocie, olivy, nakladané údeniny, omáčky, kečup, horčica, majonéza, margaríny a ďalšie [20, 22, 24].

Väčšina ľudí znáša kyselinu benzoovú v povolených koncentráciách bez akýchkoľvek nežiadúcich účinkov. U citlivých jedincov sa však môžu nežiadúce účinky objaviť. Hladina kyseliny benzoovej v nápojoch stanovená európskou legislatívou je 150 mg/l. Najvyššie prípustné množstvo kyseliny benzoovej v nealkoholickom sudovom pive je 200 mg/l. Bola vyjadrená obava, že kyselina benzoová a jej soli môžu reagovať s kyselinou askorbovou (vitamín C), v niektorých nealkoholických nápojov za tvorby malého množstva benzénu. Výskumy ukazujú, že tvorba benzénu sa zvyšuje za zvýšenej teploty a svetla, ale je potlačovaná prítomnosťou cukru [20, 41].

2.6.7 Faktory ovplyvňujúce obsah organických kyselín v pive

Organické kyseliny majú význam v pive ako chuťové a vonné látky, ovplyvňujú pH piva a náchylnosť na napadnutie iným nežiadúcim organizmom [2].

2.6.7.1 pH piva

pH piva ma dopad na povahu a prítomné množstvo organických kyselín [2].

2.6.7.2 Kvasinkový kmeň

Kvasinkový kmeň zreteľne ovplyvňuje hladinu organických kyselín v konečnom pive. Podmienky pre rozmnožovanie kvasiniek majú podstatný vplyv na množstvo hromadenia kyselín [2].

2.6.7.3 Zdroj dusíku

Metabolizmus organických kyselín, ktoré sú vylučované kvasinkami úzko súvisí s metabolizmom aminokyselín. Zdroj dusíku ovplyvňuje množstvo jednotlivých organických kyselín vo fermentovaných médiách a tiež úplné množstvo vylúčených kyselín. Pridanie aminokyseliny voľnej alebo vo forme soli do média spôsobuje zmenu pH, ktorá ovplyvňuje vyučovanie organických kyselín [2].

2.7 Elektroseparačné metódy pre analýzu organických kyselín v pive

Základom týchto metód je pohyb elektricky nabitých častíc v dôsledku pôsobenia elektrického poľa. Častice s kladným nábojom (katióny) sa pohybujú k negatívne nabitej elektróde (katóde) a častice s negatívnym nábojom (anióny) sa pohybujú ku kladne nabitej elektróde (anóde). Základom elektromigračných technik sú elektrokinetické javy a rozdielna pohyblivosť rôznych druhov častíc [9, 25].

Elektromigračné techniky sú techniky určené primárne k separácii a následnej detekcii látok obsahujúcich elektrický náboj. Podľa priebehu separácie ich rozdeľujeme na zónovú elektroforézu, izotachoforézu, izotachoforetickú fokusáciu, elektrochromatografiu a micelárnu elektrokinetickú chromatografiu. Podľa prostredia, kde prebieha separácia rozoznávame elektromigračné techniky na papieri, gélu alebo vo voľnom elektrolyte. Je možné prepájať techniky navzájom. Príkladom je prepojenie izotachoforézy zo zónovou elektroforézou u diskovej elektroforézy alebo on-line kombináciou izotachoforézy zo zónovou elektroforézou v kapilárnom prevedení. Výhodou ich on-line spojenia je, že umožňuje nadávkovať veľké objemy vzorku s nízkymi koncentráciami analytu, ktoré sa v prvom kroku izotachoforézou zakoncentrujú do zón ohraničených ostrými rozhraniami a tie sa potom citlivo analyzujú v druhom kroku metódou zónovej elektroforézy [10].

Kapilárne elektromigračné separačné metódy sa vyznačujú malou spotrebou vzorku a činidiel potrebných pre separáciu. Výhodami sú veľká účinnosť separácie, veľká rýchlosť analýzy, krátka doba potrebná na optimalizáciu separačných podmienok, jednoduchá obsluha a schopnosť analyzovať širokú škálu látok. Nevýhodami sú menšia reprodukovateľnosť a nižšia citlivosť [4, 8].

2.7.1 Elektroforéza

Elektroforéza je charakterizovaná pohybom nabitých častíc v roztoku vplyvom elektrického poľa a ich separáciou na samostatné zóny jednotlivých látok. Rýchlosť akou sa častica v danom roztoku pohybuje je priamo úmerná intenzite elektrického poľa (viď. rovnica č. 1).

$$v = u \cdot E \tag{1}$$

kde v je rýchlosť častice, E je intenzita elektrického poľa, u je elektroforetická pohyblivosť [6, 26].

2.7.2 Elektroforetická pohyblivosť

Môže slúžiť k identifikácii analyzovaných organických látok, pretože je špecifickou vlastnosťou katiónov a aniónov vzniknutých protonizáciou, či disociáciou organických

zlúčenín (viď. Rovnica 2). Katióny a anióny organických látok sa chovajú ako slabé kysliny a zásady, preto je ich elektroforetická pohyblivosť závislá na pH použitého separačného pufru

$$\begin{aligned} HA + H_2O &\rightarrow A^- + H_3O^+ \\ B + H_2O &\rightarrow BH^+ + OH^- \end{aligned} \qquad (2)$$

Najväčšiu elektroforetickú pohyblivosť bude organická zlúčenina vykazovať v stave úplnej disociácie, prípadne protonizácie a nazývame ju iónová pohyblivosť. Naopak nulová elektroforetická pohyblivosť je v prípade plnej deprotonizácie organickej zlúčeniny. Efektívna elektroforetická mobilita tvorí rozhranie medzi iontovou a nulovou pohyblivosťou [8].

2.7.2.1 Efektívna pohyblivosť

Je daná celkovou pohyblivosťou všetkých častíc rovnakého pôvodu (typu), ktoré sa vzájomne rýchlo premieňajú rovnovážnymi reakciami, a preto sa vo svojej zóne pohybujú spoločne. Ako príklad uvedieme efektívnu pohyblivosť dvojsýtnej kyseliny H_2A, ktorá závisí na acidobázických rovnováhach (viď. Rovnica č. 3)

$$\begin{aligned} H_2A &\leftrightarrow H^+ + HA^- \\ HA^- &\leftrightarrow H^+ + A^{2-} \end{aligned} \qquad (3)$$

Preto v jednej zóne spoločne migrujú nie len anióny HA^- a A^{2-}, ale aj molekuly H_2A. Efektívna pohyblivosť kyseliny H_2A je potom daná vzťahom:

$$u_{ef} = \frac{u_{HA^-} \cdot c_{HA^-} + u_{A^{2-}} \cdot c_{A^{2-}}}{c_{anal}}, \qquad (4)$$

kde c_{anal} je celková analytická koncentrácia kyseliny, c_{HA^-}, $c_{A^{2-}}$ sú koncentrácie ich ionizovaných foriem pri danej hodnote pH a u_{HA^-}, $u_{A^{2-}}$ sú ich pohyblivosti [7].

Iónové (efektívne) mobility sú závislé na teplote a iónovej sile prostredia. Limitné iónové mobility merané pri 25 °C a extrapolované pre nekonečne zriedené roztoky sú uvedené v chemických tabuľkách. Efektívna mobilita slabých elektrolytov závisí na pH prostredia a jej priebeh popisuje priebeh disociačnej krivky [10].

2.7.3 Elektroosmotický tok a elektroosmóza

Medzi elektrokinetické javy uplatňujúce sa v elektromigračných technikách patrí elektroosmóza, elektroosmotický tok a molekulárna difúzia [8, 9].

Elektroosmotický tok ani elektroosmóza nehrá rolu v CITP z dôvodu prítomnosti veľkej molekuly metyl - hydroxycelulózy vo vodiacom elektrolyte, ktorá potlačuje elektroosmózu. Ďalším dôvodom neprítomnosti elektroosmózy a elektroosmotického toku je elektricky inertná kapilára vyrobená z organického polyméru. Elektroosmotický tok vzniká napríklad v CZE, kde sa využívajú kapiláry z kremeňa [25].

2.7.4 Molekulárna difúzia

Na rozhraní medzi izotachoforetickými zónami dvoch látok sa ich koncentrácia skokom mení a prítomný koncentračný gradient, vedie k difúzii iónov zo svojej zóny do zóny susednej. Difúzny tok pôsobí v smere kolísajúcej koncentrácie a samozaostrujúci efekt pôsobí proti vzniknutému difúznemu toku [6].

2.8 Izotachoforéza

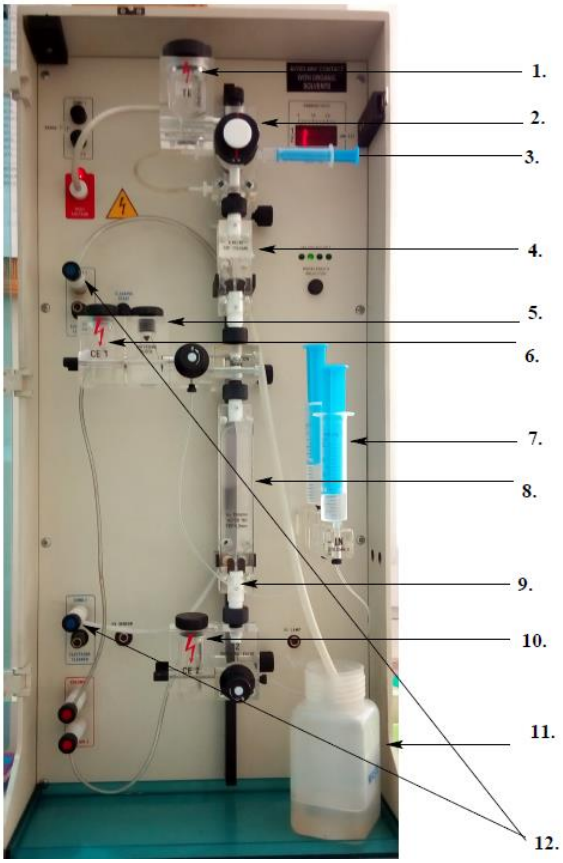
Izotachoforéza (ITP) je elektroanalytická separačná metóda, umožňujúca delenie aniónov alebo katiónov na základe ich rozdielnej efektívnej pohyblivosti (u_{ef}) v jednosmernom elektrickom poli o vysokom napätí. Aplikácia vysokého napätia napomáha účinnosti separácie ale v praxi je to limitované kvôli Joulovému teplu, ktoré sa objavuje, keď roztokom prechádza, elektrický prúd. Aplikácia vysokého napätia je výhodou, iba keď teplo môže byt účinne rozptýlené, pretože prúdenie tepla inak vedie k mixovaniu zón, ktoré boli separované [7, 28].

Polaritu elektród volíme podľa toho, ktorý druh iónov chceme stanoviť a podľa toho potom delíme izotachoforézu na katiónovú a aniónovú. Vzorka je pred separáciou dávkovaná na rozhranie medzi vedúci a koncový elektrolyt. Zloženie vedúceho a koncového elektrolytu je rozhodujúce pre delenie iónov do zón. Ióny migrujú k opačne nabitej elektróde separačnou kapilárou, v ktorej sa postupne delia a vytvárajú zóny, obsahujúce iba jeden druh iónov. Tieto zóny migrujú kapilárou rovnakou rýchlosťou do miesta detekcie (z tade pochádza názov izo - tacho) [7, 25].

Izotachoforéza je analytická separačná technika, ktorá umožňuje analyzovať zmesi ionogénnych látok v roztokoch a získať v krátkej dobe údaje o kvalitatívnom i kvantitatívnom zložení vzorku. Izotachoforéza pracuje s malými množstvami vzorku a umožňuje stanoviť desiatky ng látok. Sú pre ňu špecifické ostré zónové rozhrania oddeľujúce odseparované zóny jednotlivých čistých zložiek vzorku. Po ukončení separácie, každá zóna obsahuje okrem protiiónu iba ióny jednej látky. Všetky zóny migrujú rovnakou rýchlosťou, stýkajú sa ostrým rozhraním a postupom času sa nerozmývajú [6].

Analýza prebieha na izotachoforetickom analyzátore. Konkrétne naše meranie prebiehalo na elektroforetickom analyzátore EA 101, ktorý je zobrazený i s popisom na Obr. 4 .

2.8.1 Inštrumentácia



1. rezervoár koncového elektrolytu,
2. dávkovač,
3. striekačka pre dávkovanie vzorku,
4. predseparačná kolóna,
5. tlmiaci blog,
6. rezervoár vedúceho elektrolytu,
7. striekačka s vedúcim elektrolytom,
8. analytická kolóna,
9. držiak kolóny UV detektoru,
10. rezervoár vedúceho elektrolytu analytickej kolóny,
11. odpadná nádobka,
12. konektory vstupu vodivostného detektoru

Obr. 4: Elektroforetický analyzátor EA 101.

2.8.2 Množstvo a charakter vzorku

Vzorka môže byť dávkovaná dávkovacím kohútom, alebo injekčnou striekačkou. Požadovaný objem vzorku je kompromisom medzi citlivosťou a rýchlosťou analýzy. Pri priamej analýze sa analyzuje 1 – 10 µl vzorku. Pri stanovení stopových koncentrácií analyzovaných látok, musí byť objem úmerne vyšší. Vzorky kvapalín o dostatočnej vodivosti môžu byť analyzované priamo. Ak je vodivosť vzorky malá, roztok sa v mieste nástreku ľahko prehrieva, potom je treba pridať ku vzorke vedúci alebo koncový elektrolyt, alebo je treba analyzovať menší objem vzorku. Pri analýze plynných vzorkou sa vzorka nechá prebublávať takou kvapalinou, v ktorej sa analyzovaná látka kvantitatívne zachytí a vzniknutý roztok sa analyzuje priamo, alebo po zakoncentrovaní. Pevné vzorky je treba pred analýzou zhomogenizovať a analyzované látky vyextrahovať do vhodného rozpúšťadla. Takto vzniknutý roztok sa zakoncentruje a zanalyzuje [6].

2.8.3 Základné údaje

Separačná kapilára je vyrobená z vhodného organického polyméru PTFE (polytetraflourethylen), alebo FEP (kopolymér perflourovaného polyethylenu a polypropylenu) o vnútornom priemere < 1 mm, obvykle 0,05 – 0,8 mm. Konce kapiláry sú pripojené k elektródovým nádobkám, ktoré obsahujú vedúci elektrolyt (LE) a koncový elektrolyt (TE) a platinové elektródy pre pripojenie zdroja vysokého napätia (HV) dodávajúceho konštantný

jednosmerný prúd. Rozsah prúdu sa pohybuje v rozmedzí 5 až 500 μA. Prúd je automaticky regulovaný na konštantnú hodnotu. Rezervoár s LE je oddelená od kapiláry semipermeabilnou membránou, ktorá bráni hydrodynamickému toku elektrolytu [6, 7, 10].

2.8.4 Používané elektrolytové systémy

Ako vedúci ión je vhodný rýchly ión plne disociovanej látky. Ako terminátor sa používa H^+, alebo OH^- ión, ktoré musia tvoriť poslednú zónu systému. Látky, u ktorých ich zónami, môže niektorý z uvedených iónov prenikať smerom do vedúcej zóny, nemôžeme použiť ako terminátor, ani ich reprodukovateľne analyzovať. Ak je prirodzený terminátor tvorený H^+ alebo OH^- príliš pomalý, teda jeho zóna má príliš vysoký gradient elektrického potenciálu, je možné použiť ako terminátor inú látku s vhodnou efektívnou pohyblivosťí vlastnej zóny. Obecne sa ako terminátor môže použiť taká slabá kyselina alebo báze, ktorej iónová pohyblivosť je nižšia, než je pohyblivosť separovaných látok a ich hodnota pKa je nižšia (v prípade katiónu) a vyššia (v prípade aniónu), než hodnoty pKa všetkých separovaných látok. Vhodný vedúci ión môže byť pri katiónovej izotachoforeze napríklad K^+, NH^{4+}, Na^+. Pri aniónovej izotachoforeze Cl^- [6].

2.8.4.1 Podmienky pre vhodný elektrolytový systém

Analyzované látky by mali byť chemicky stabilné, dostatočne ionizované a rovnováhy medzi jednotlivými formami viacsýtnych elektrolytov alebo komplexov by sa mali ustaľovať rýchlejšie než je migračná rýchlosť jednotlivých foriem. Koncentrácia analytu po dosiahnutí rovnovážneho stavu nesmie prekročiť súčin rozpustnosti, aby látky zo systému nevypadávali. Voľba elektrolytového systému ovplyvňuje citlivosť, rýchlosť analýzy a presnosť vyhodnotenia záznamu z detektoru. Efektívne mobility sledovaných látok sa dajú vhodne ovplyvniť zmenou rôznych parametrov elektrolytu. Napríklad zmenou pH alebo obsahom komplexujúcich činidiel v separačnom médiu [10].

2.8.4.2 Rozdelenie elektrolytových systémov

Obecne sa elektrolytové systémy delia na pufrované, nepufrované a bez pufru. V pufrovanom systéme tvorí L (vedúci ión) v závislosti podľa analýzy aniónov alebo katiónov, anión silnej kyseliny, alebo silnej báze. Protión je slabá báza, alebo anión silnej kyseliny. Terminátorom musí byť vždy hydroxylový alebo hydroxoniový ión, prípadne pre zrýchlenie analýzy ióny s vyššou efektívnou mobilitou, než je mobilita hydroxylového alebo hydroxoniového ionu pri danom pH. V systéme bez pufru je rozdiel iba v protióne, ktorým je hydroxoniový alebo hydroxylový ión, ktorý v tomto prípade nemôže byť terminátorom. Nepufrovaný systém je systém, kde vedúcim iónom je hydroxylový a hydroxoniový ion, protiónom je silná báza, alebo anión silnej kyseliny a koncový ión je anión slabej kyseliny, alebo slabej báze [10].

2.8.5 Izotachoforetická analýza

Na začiatku analýzy sa vzorka umiestni na koniec separačnej kapiláry medzi dva elektrolyty s odlišnou pohyblivosťou iónu. Jedná sa o vedúci elektrolyt (LE), ktorý na začiatku analýzy

vypĺňa anódový a separačný priestor a koncový elektrolyt (TE), ktorým je na začiatku analýzy naplnený katódový priestor [26].

Ak separujeme anióny (pre katióny je postup analogický), anióny vedúceho elektrolytu majú vyššiu pohyblivosť ako ktorýkoľvek anión vzorku a anióny koncového elektrolytu majú naopak menšiu pohyblivosť, než ktorýkoľvek anión vzorku (viď. Rovnica 5).

$$\mu_{LE} \rangle \mu_A \rangle \mu_B \rangle \mu_{TE} . \tag{5}$$

Okrem separovaných aniónov sú vždy prítomné i opačne nabité protióny, ktorých prítomnosť je podmienkou zachovania elektroneutrality v zónach. Zložka vedúceho a koncového elektrolytu migrujúca opačným smerom, než analyt sa nazýva protiión. Protióny vo všetkých elektrolytoch (vedúcom, separovanom i koncovom) musia byť rovnaké [7, 25, 27].

Po pripojený jednosmerného napätia na elektródy, umiestnené v katódovom a anódovom priestore, pri konštantnej hodnote prúdu (I) sa začnú anióny pohybovať kapilárou k anóde rôznou rýchlosťou, podľa ich hodnoty u_{ef}. Po určitej dobe ióny vytvoria ostro ohraničené zóny o dĺžke (l) s jedným typom aniónu. Sú zoradené podľa klesajúcich hodnôt u_{ef} až sa dosiahne ustáleného stavu (konštantného prúdu). Ióny v zóne sa potom pohybujú rovnakou rýchlosťou k anóde. Keď je dosiahnutá rovnováha sú vytvorené oddelené zóny LE, vzorky a TE a cestujú rovnovážnou rýchlosťou cez kapiláru podľa nižšie uvedenej rovnice.

$$v_{ITP} = \mu_{LE} E_{LE} = \mu_A E_A = \mu_B E_B = \mu_{TE} E_{TE} , \tag{6}$$

kde v_{ITP} je rýchlosť zóny v rovnováhe izotachoforézy a indikátory A a B odpovedajú vzorkám rozpustenej látky A a B.

Pre ustálený stav pri stálom priereze separačnej kapiláry (A) a konštantnej hustote prúdu (I/A) platí, že sa napätie v kapiláre rozdelí podľa vodivostných zón, pretože v zóne s ióny o veľkej pohyblivosti je menší elektrický odpor (R) a naopak. Potom má každá zóna charakteristickú konštantnú mernú vodivosť (κ) a intenzitu elektrického poľa (E_p). Najnižšiu intenzitu poľa bude mať LE. Podľa Ohmovho zákona platí

$$E_p = \frac{I}{\kappa \cdot A} \; [V \cdot cm^{-1}]. \tag{7}$$

Intenzita elektrického poľa je konštantná v každej zóne. Koncentrácia každého aniónu (c_A) je v ich zóne konštantná a určená zložením a koncentráciou vedúceho elektrolytu, podľa Kohlrauschovy regulačnej funkcie:

$$\frac{c_A}{c_L} = \frac{u_A (u_L + u_K)/z_L}{u_L (u_A + u_K)/z_A} , \tag{8}$$

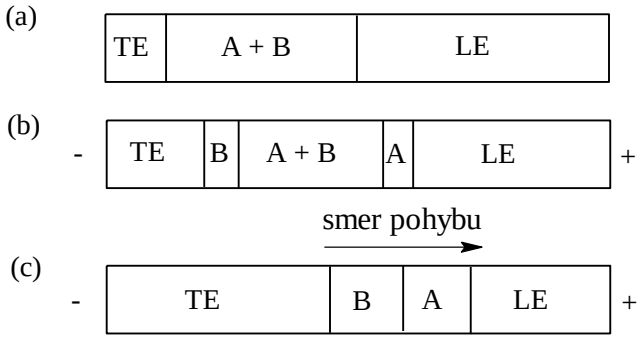
kde u_K je pohyblivosť katiónu (protionu),

u_L je pohyblivosť aniónu vedúceho elektrolytu,

u_A je pohyblivosť aniónu stanovovanej látky tvoriaceho zónu,
z_L, z_A sú nábojové čísla aniónov vo vedúcom elektrolyte a v zóne,
c_L, c_A sú ich koncentrácie.
Zjednodušene môžeme Kohlrauschovu regulačnú funkciu vyjadriť takto

$$c_A = c_L \cdot konšt. \tag{9}$$

Menej pohyblivé ióny sa v ustálenom stave pohybujú rovnako rýchlo ako pohyblivejšie ióny. Je to spôsobené tým, že v každej zóne je iný gradient potenciálu (potenciálový spád). Gradient potenciálu sa vytvára tým vyšší, čím menej pohyblivé ióny sa v zóne nachádzajú. Preto na menej pohyblivé ióny pôsobí väčšia hnacia sila. Jednotlivé zóny sú v ustálenom stave veľmi ostré, pretože tam pôsobí samozaostrujúci efekt. Ak opustí kation vplyvom difúzie svoju zónu a dostane sa do zóny menej pohyblivých katiónov, kde naň pôsobí väčší gradient potenciálu, je zvýšením hnacej sily kation poháňaný späť do svojej zóny [7, 26, 27, 28].



Obr. 5:Schéma izotachoforetickej analýzy [25].

Na Obr. 5 je zobrazená schéma izotachoforetickej analýzy, ktorá stručne v 3 bodoch A - C popisuje princíp analýzy.

A. Kapilára je naplnená vodiacim elektrolytom, vzorkou obsahujúcou zložky A a B a koncovým elektrolytom.
B. Po pripojený jednosmerného napätia na elektródy, ióny v roztoku migrujú rôznymi rýchlosťami. Po určitej dobe ióny vytvoria ostro ohraničené zóny s jedným typom aniónu. Sú zoradené podľa klesajúcich hodnôt u_{ef} .
C. Po dosiahnutí ustáleného stavu (konštantného prúdu) sa ióny v zóne pohybujú rovnakou rýchlosťou k anóde. Keď je dosiahnutá rovnováha, sú vytvorené oddelené zóny LE, vzorky a TE a cestujú rovnovážnou rýchlosťou cez kapiláru [25].

2.8.6 Separácia a detekcia

Cieľom separačnej analýzy je úplná vzájomná separácia všetkých sledovaných zložiek vzorku tak, že sú vytvorené izotachoforetické zóny individuálnych látok. Cieľom druhého kroku je detekcia analyzovaných látok. Metódu charakterizuje rýchlosť, citlivosť a presnosť analýzy. Rýchlosť analýzy je závislá na zložení vedúceho elektrolytu, použitej hodnote hnacieho prúdu a dávkovaného množstva vzorku k analýze [6].

Pri detekcii prechádzajú jednotlivé zóny detekčnou celou a ich priechod je snímaný a zapisovaný do podoby izotachoforegramu. Detekčná cela má istú minimálnu dĺžku v smere migrácie. Čím je dĺžka detegovanej zóny väčšia, než dĺžka detekčnej cely, tým je vplyv detekčnej cely relatívne menší a kvalitatívne vyhodnotenia presnejšie. Pre detekciu je výhodné, aby bolo nastrekované čo najväčšie možné množstvo vzorku, aby výsledné zóny boli čo najdlhšie. Naopak pre rýchlu a úplnú separáciu je treba zón čo najkratších a pre presnú detekciu je treba zón čo najdlhších. V ideálnom prípade sa vyhovie presnosti separácie a detekcia sa musí previesť, čo najskôr po ukončení separácie.

K detekcii môžu byť využité tieto vlastnosti alebo veličiny: gradient elektrického potenciálu, merná vodivosť, teplota, pH, koncentrácia protiónu [6].

2.8.7 Detektory

Detektory pre izotachoforézu musia byť o vysokej špecifite a citlivosti a delia sa na dve skupiny:

2.8.7.1 Univerzálne detektory

Ich odozva je určená pohyblivosťou iónov v zóne. Teda reagujú na pohyblivosť látok. Každá jednotlivá zóna dáva detekčný signál.

Rozdelenie:

1. Vodivostné – meria sa vodivosť zóny prechádzajúca cez detektor. Čidlom u kontaktných detektorov sú dva platinové drôty, vzdialené v smere osy kapiláry asi 0,1 mm, Napätie medzi týmito drôtmi je úmerné gradientu potenciálu zóny.
2. Teplotné – merajú teplotu v určitom mieste kapiláry. Zóny, v ktorých je väčší potenciálový spád, majú vyššiu teplotu, pretože v nich vzniká vyššie Jouleovo teplo. Nepoužívajú sa pre malú citlivosť
    a. Termočlánky,
    b. Termistory.
3. Potenciálovo gradientový.
4. Voltametrické a amperometrický detektory [7, 27].

Výhodou univerzálnych elektrochemických detektorov je, že nevyžadujú chromofor alebo derivatizáciu pre detekciu vzorky v porovnaní s UV detekciou. Nevýhoda tohto typu detekcie je potreba oddeliť vysokú elektrickú intenzitu poľa, slúžiacu na separáciu analytov od detekčnej zóny, ktorá je veľmi citlivá na prúd alebo napätie. Izotachoforegram poskytnutý univerzálnym detektorom vyzerá tak, že informáciu o kvalite poskytuje výška zóny (h) a o kvantite šírka zóny (l) [25, 27].

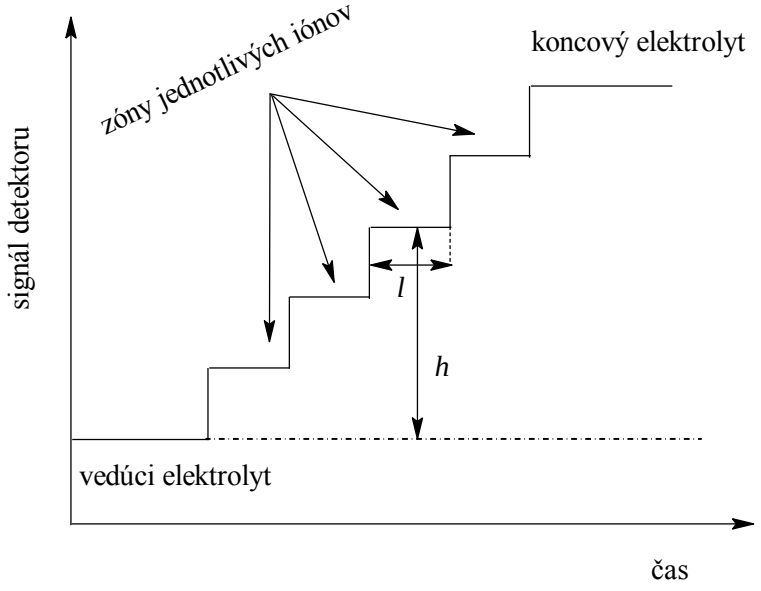
2.8.7.2 Špecifické detektory

Ich odozva je určená inými vlastnosťami v zóne, než elektroforetickou pohyblivosťou. Špecifická detekcia sa dá použiť iba pre látky absorbujúce v UV oblasti (predovšetkým organické kyseliny). Selektívne (špecifické) detektory podávajú informáciu o vybranej analytickej vlastnosti sledovanej zóny. Najrozšírenejším selektívnym detektorom v izotachororetickej analýze je fotometrický detektor v UV oblasti. Princípom detekcie je

meranie intenzity žiarenia zdroja konštantného svetelného toku po prechode detekčnou celou separačnej kolóny. Žiarenie je monochromatizované filtrom. UV detekcia má použitie pre zisťovanie identity štandardných látok s látkami vzorku, ako aj pre odhad neznámych látok. Selektívny detektor môže pri určitom usporiadaní spĺňať funkciu univerzálneho detektoru. Táto vlastnosť UV detektoru sa využíva v prípade detekcii látok, ktoré samy neabsorbujú v danej oblasti žiarenia. Vtedy je použitý protión, ktorý sám vykazuje meranú vlastnosť. Pri UV absorpčnej detekcii sa absorpcia v detekčnej cele bude od zóny k zóne meniť tak, ako sa v jednotlivých zónach bude meniť koncentrácia absorbujúcej zložky. Ako výsledok analýzy získame schodovitý záznam, podobne ako u univerzálneho detektoru [6].

2.8.8 Výsledok analýzy

Výsledkom delenia iónov v izotachoforéze je izotachoforegram uvedený na Obr. 6. Každému rozdelenému iónu odpovedá na izotachoforetickej krivke „schod“, ktorého dĺžka (l) charakterizuje látkové množstvo iónu zložky vo vzorke a výška zóny („schodu“) (h) určuje kvalitu analyzovaných iónov v danom elektrolytovom systéme [10].



Obr. 6: Izotachoforegram [27].

Kalibračná krivka je závislosť dĺžky vlny na zázname na dávkovanom množstve analytu, teda koncentrácii. Množstvo látky sa prejaví na zázname tým dlhšou vlnou, čím nižšia bola koncentrácia na ktorú sa analyt upravil a čím menší je prierez kapiláry. Najrozšírenejší spôsob detekcie je meraním vodivosti (odporu) v zóne alebo gradientu. V tomto prípade k identifikácii anayltu slúži výška vlny na zázname. U optickej detekcie je výška vlny daná extinkčným koeficientom, ktorý charakterizuje zónu a druhým sledovaným parametrom je poradie vĺn na zázname [10].

2.8.8.1 Kvalitatívna analýza

Kvalitatívna analýza v izotachoforéze nie je schopná poskytnúť priamy údaj o zložení vzorku, preto vždy vychádzame zo štandardnej zmesi takého zloženia aké predpokladáme vo vzorku. Vlny izotachoforegramu identifikujeme tak, že priradíme každej vlne odpovedajúcu štandardnú látku. Potom analyzujeme vlny izotachoforegramu vzorku, porovnaním izotachoforegramu vzorku s izotachoforegramom štandardnej zmesi [6].

2.8.8.2 Kvantitatívna analýza

Pre kvantitatívnu analýzu v kapilárnej izotachoforéze sa používajú všetky techniky ako u kvapalinovej chromatografie.

Rozoznávame 4 typy kvantitatívneho vyhodnotenia ITP analýzy:

1. Kalibrácia vonkajším štandardom.
    a. Metóda priameho porovnania,
    b. Metóda kalibračnej krivky,
2. Technika vnútorného štandardu.
3. Technika štandardného prídavku.
4. Technika vnútornej normalizácie - jediná z týchto technik nemá veľké uplatnenie v praxi, pretože poskytuje výsledky iba vo forme molových zlomkov, čo je po vztiahnutí iba na katióny a anióny málo využiteľné.

Metóda kalibračnej krivky

Metóda kalibračnej krivky je najpoužívanejšia metóda a využíva sa hlavne pre sériové analýzy. Princíp spočíva v konštrukcii kalibračného grafu na základe série nástrekov rôznych definovaných množstiev štandardnej látky. Kalibračný graf má na ose x koncentráciu a na ose y dĺžku vlny (zónu) [6].

Na presnosť kvantitatívnej analýzy kapilárnej izotachoforézy má vplyv koncentrácia vzorku, regulácia teploty, iónová sila elektrolytu, režim nástreku [4].

2.8.9 Využiteľnosť metódy

Je metóda vhodná pre kvantitatívnu analýzu predom zvolených látok. Nie je vhodná k identifikácii neznámych zložiek vzorku. Izotachoforéza je metóda vhodná pre analýzu látok ionogénnej povahy, teda tých, ktoré sú v danom rozpúšťadle (najčastejšie vode) pomerne jednoducho ionizovateľné. Ale výhodou je, že neionogéne látky, ktoré sú hlavnými zložkami analyzovaného vzorku nerušia analýzu ionogénnych látok [6, 7].

Analyzovaná látka musí byť rozpustná v danom rozpúšťadle, inak hrozí vypadávanie analyzovanej látky z roztoku a zhoršenie presnosti a správnosti analýzy, prípadne úplne znemožnenie analýzy. Izotachoforézou môžu byť analyzované katióny, kedy môžu interferovať iba kationogenne látky, alebo sú anylzovavané anióny, kedy interferujú iba anionogénne látky. Výhodou je, že v izotachoforéze sú látky delené na základe rozdielnych efektívnych pohyblivostí a nie na základe rozdielnych chemických vlastností alebo zloženia. Vďaka tomu môžu byť počas jednej analýzy na raz stanovené ionogénne látky úplne rozdielnej povahy, napr.

anorganické a organické ióny. Výnimkou je kapilárna izotachoforéza s detekciou on-line. Tento typ izotachoforézy, nie je schopný analyzovať viac vzorkou súčasne, ďalšia vzorka môže byť analyzovaná, až po ukončení analýzy predchádzajúceho vzorku a premytí kapiláry vedúcim elektrolytom [6].

2.8.9.1 Využitie kapilárnej izotachoforézy v analýze potravín

Kapilárna izotachoforéza sa využíva pre stanovenie anorganických a organických iónov v potravinách a nápojoch. Konzervačné látky ako kyselina sorbová, propiónová, benzoová a estery kyseliny benzoovej, môžu byť analyzované v rôznych druhoch potravín po extrakcii z lipidovej fáze. V nápojoch a konzervovaných potravinách môžu byť analyzované sladidlá ako cyklamát a sacharin. Ďalej môžu byť v potravinách analyzované aditíva ako glutaman, GMP, IMP [5].

Hladiny obsahu organických kyselín vo vzorkách sú vo väčšine prípadov dostačujúce k priamemu stanoveniu bez úpravy vzorku, prípadne vyžadujú iba minimálne predbežné úpravy ako je zriedenie alebo filtrácia [5].

2.8.10 Porovnanie izotachoforezy s inými analytickými metódami

Výhodou izotachoforézy oproti chromatografickým metódam je, že sa väčšina analýz obíde bez predbežných úprav vzorku, čo znižuje časové nároky na stanovenie. Izotachoforézou sa dá stanovovať zložky vzorku v rozmedzí koncentrácii 10^{-4} – 10^{-1} mol·l^{-1}. Cena prístrojového vybavenia pre izotachoforézu je oveľa nižšia, než inštrumentácia pre HPLC. Ďalšou výhodou ITP je nízka spotreba chemikálii a celkovo nižšie náklady na jednu analýzu oproti HPLC a tým aj nižšie zaťaženie odpadných vôd a celkovo životného prostredia. Ďalšou výhodou ITP je, že potravinársky výrobok je komplexná heterogénna matrica, ale zložky ako sacharidy, škrob vláknina sú neionogénne a nerušia stanovenie ionogénnych zložiek potravín. Pri ITP sa separáciou vo voľnom roztoku v kapiláre eliminujú nežiaduce interakcie analytu s nosičom, čo sa deje v prípade chromatografických analýz. Nevýhodou izotachoforézy je, že výsledkom separácie je sústava zón analyzovaných látok, ktoré na seba priamo nadväzujú. Kapilárna izotachoforza má dva typy usporiadania jednokapilárová a spojené kapiláry. Rozdiel v týchto dvoch usporiadaniach uvádza Tab. 4 [7, 9].

Tab. 4: Základné parametre pre kapilárnu izotachoforézu [9].

Parameter	Jednokapilárová ITP	Spojené kapiláry v ITP
Doba analýzy [min]	5 – 60	5 – 45
LOD [pmol]	~ 10	~ 1
Dávkované množstvo [µl]	1 - 50	1 - 300
Minimálna stanoviteľná koncentrácia [mol/l]	Až 10^{-6}	Až 10^{-8}
Maximálny pomer stanovovaných zložiek	1 : 100	Až 1 : 10^{-6}

2.8.11 Presnosť a citlivosť metódy

Presnosť izotachoforetickej analýzy závisí na

1. Presnosti merania náboja prechodu zóny detektorom,

2. Správnosti vymytia vzorku z predchádzajúcej analýzy z kolóny,
3. Vylúčenia hydrodynamických tokov v kolóne,
4. Zaistenia prechodu analyzovanej látky zo vzorku detekčnou celou [6].

Zvýšenie citlivosti ITP sa dá dosiahnuť zaradením užšej kapiláry za širšiu predseparačnú kapiláru a prevedením dvoch ITP analýz za sebou s prípadným odseparovaním nežiadúcich látok k pomocnej elektróde [10].

2.9 Chromatografia

Chromatografia je separačná metóda, založená na rovnovážnom rozdelení zložiek vzorku medzi dvoma fázami, stacionárna (nepohyblivá) a mobilná (pohyblivá). Princípom separácie sú rozdiely v afinite zložiek vzorku k stacionárnej a mobilnej fázy. V súčasnej dobe sa pri všetkých chromatografických technikách pracuje elučným spôsobom, kedy sa do pretekajúcej mobilnej fáze dávkuje veľmi malé množstvo vzorku [8, 10, 11, 29].

V kvapalinovej chromatografii je mobilná fáza kvapalina a stacionárna fáza je tuhá látka alebo kvapalina zakotvená na tuhom nosiči. U vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografii je mobilná fáza privádzaná do systému pomocou čerpadla za vysokého tlaku a stacionárna fáza je umiestnená v chromatografickej kolóne vo forme sorbentu. Kvapalinová chromatografia je univerzálna technika. Môžeme ju požiť pre separáciu tepelne nestálych látok, silne polárnych, iónových, vysokomolekulárnych, prírodných alebo syntetických polymérov [8, 10, 11, 29].

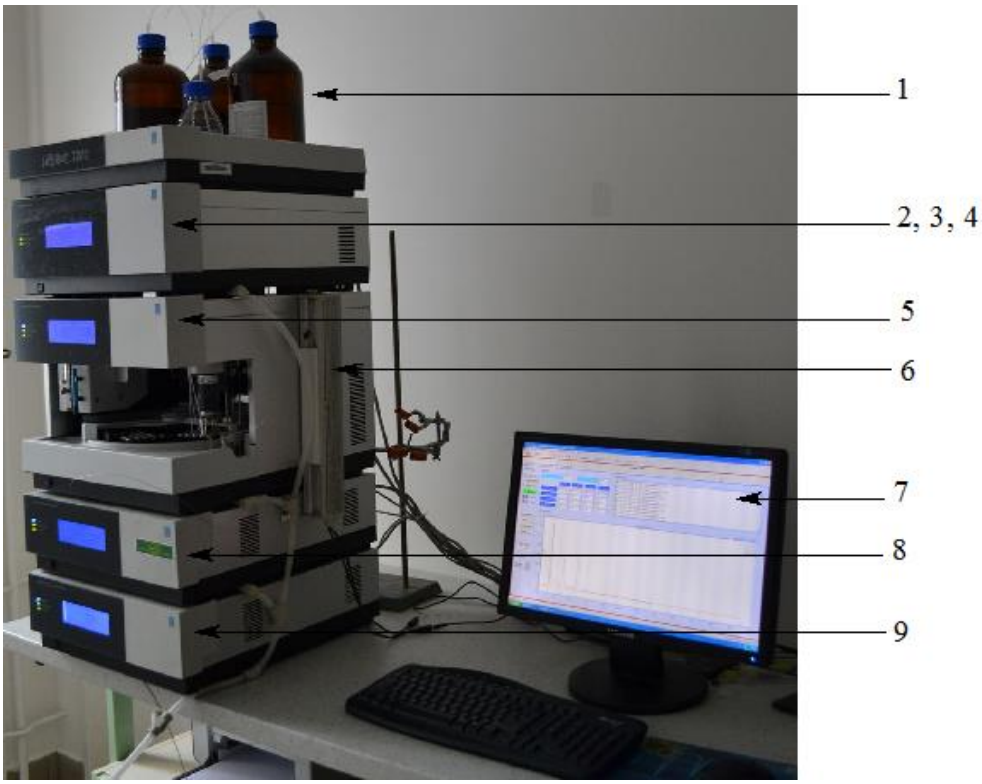
Má dva typy usporiadania plošné (papierová chromatografia alebo na tenkej vrstve adsorbentu - TLC) alebo kolónové usporiadanie – HPLC. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) má oproti chromatografii v plošnom usporiadaní vyššiu citlivosť a rýchlejšiu separáciu. Získaný záznam po separácii jednotlivých zložiek vzorku sa nazýva chromatogram. Chromatogram predstavuje časový záznam signálu detektoru zo vzájomne oddelenými elučnými píkmi jednotlivých látok [8, 10, 11, 29].

2.9.1 Princíp separácie

Mobilná fáza sa zo zásobníku cez zariadenie pre zavádzanie vzorku dávkuje vysokotlakým čerpadlom na separačnú kolónu. Z kolóny sa prevádza do detektoru, ktorý poskytuje elektrický signál ako odozvu úmernú zmene sledovanej vlastnosti eluátu vytekajúceho z kolóny. Časová závislosť elektrického signálu sa zaznamenáva ako chromatogram pomocou počítača s analogovo - digitálnym prevodníkom a zbernicou dát, kde sa signál automaticky vyhodnocuje a spracováva. Zložky vzorku sa dajú identifikovať na základe zhody ich elučních časov s retenčnými časmi štandardov. Z výšok alebo plôch píkov je možné stanoviť obsah zložiek vo vzorku [8, 10, 11].

2.9.2 Inštrumentácia

Na Obr. 7 je schéma kvapalinového chromatografu a jeho častí. Popis prístroja je uvedený prostredníctvom čísel 1 – 9: 1. zásobníky mobilných fáz, 2. vákuový odplyňovač, 3. zmiešavač, 4. vysokotlaké čerpadlo, 5. automatický dávkovač, 6. termostat a kolóna, 7. počítač spolu so softwarem, 8. detektor s diódovým poľom, 9. fluorescenčný detektor.



Obr. 7: Inštrumentácia vysokoúčinného kvapalinového chromatografu.

2.9.2.1 Príprava MF

Príprava mobilnej fáze pozostáva z dvoch častí, zásobníku mobilnej fáze a odplyňovače.

1. **Zásobníky mobilných fáz** - sa uchovávajú vo fľašiach, ktoré majú objem 1 - 2,5 litru.

2. **Odplyňovač**

Dôvodom odplynenia mobilnej fáze je, aby pri zmene tlaku na výstupe z chromatografickej kolóny alebo aj v kolóne nedochádzalo k uvoľneniu bubliniek rozpustených plynov. Odplynením mobilnej fáze zabránime problémom, ako sú nestabilita čerpadla, zníženie citlivosti detekcie a zároveň dosiahneme opakovatelnosť retenčných časov a nízkeho šumu základnej línie. Máme dva spôsoby odplynenia. Prvý spôsob je prebublávanie héliom, kedy sú zásobníky mobilnej fáze opatrené trubicami pre prívod hélia a na konci majú fritu pre rovnomerné rozptýlenie bubliniek v zásobníku. Hélium sa veľmi málo rozpúšťa v mobilnej fáze a slúži k odstráneniu rozpusteného vzduchu z mobilnej fáze. Druhým spôsobom je vákuové odplynenie. Vákuový prietokový odplyňovač je polopriepustná membrána v tvare kapiláry, ktorá je umiestnená vo vákuovej komore pred vstupom na kolónu. Mobilní fáza sa vede kapilárou, kde je znížený tlak a dochádza tam k prestupu molekúl rozpustených plynov von cez membránu a kvapalina sa zachová. Odplynená kvapalina putuje do čerpadla [8, 10, 11, 29].

2.9.2.2 Dodávanie MF

1. **Čerpadlo**

Vysokotlaké čerpadlá zabezpečujú bezpulzný transport mobilnej fáze pri tlaku 40 MPa. Na začiatku vývoja HPLC sa používali čerpadlá pracujúce pri konštantnom tlaku. Dnes sa

používajú hlavne piestové čerpadlá, ktoré pracujú s konštantným objemovým prietokom mobilnej fáze. Príkladom sú čerpadlá z dvoma piestami v sériovom alebo paralelnom usporiadaní. Funguje to tak, že v jednej komore sa nasáva mobilná fáza zo zásobníku, z druhej sa vytlačuje na kolónu a potom sa funkcie oboch komôr vymenia. Rýchlosť pohybu piestu sa riadi elektronicky aby bol prietok bezpulzný [8, 10, 11].

2. Elúcia

a. Gradientová elúcia

Počas analýzy sa mení zloženie mobilnej fáze. Zmena môže prebiehať v nízkotlakej časti, kedy sa rozpúšťadlá miešajú v zmiešavacej komôrke pred vstupom do čerpadla a ako zmes postupujú do piestu. Pri vysokotlakom gradiente má každá zložka mobilnej fáze svoje vysokotlaké čerpadlo a je dávkovaná do zmiešavacej komúrky pred kolonou. Nutnosť použitia dvoch a viac vysokotlakých čerpadiel. Cieľom gradientovej elúcie je urýchlenie separácie. Šírka chormatografických píkov by mala byť konštantná pre všetky analyzované látky [8, 10, 11, 29].

b. Izokratická elúcia

Izokratická elúcia je charakteristická tým, že máme rovnakú mobilnú fázu po celú dobu analýzy. S rastúcou retenciou dochádza k postupnému rozširovaniu píkov [29].

2.9.2.3 Dávkovanie

V kvapalinovej chromatografii rozoznávame dva druhy dávkovania vzorku. Ručné dávkovanie pomocou dávkovacej slučky a automatické dávkovanie pomocou automatického dávkovača.

1. Dávkovací slučka

Ručne ovládaný dávkovací ventil s dávkovacou slučkou je predom naplnený vzorkou a bez prerušenia toku mobilnej fáze. Vzorka sa dávkuje ručným prepnutím ventilu do druhej polohy. Výhodou je, že ide o lacnejšiu variantu dávkovania, než je automatický dávkovač, ale chýba možnosť automatizácie. Dávkovacie ventily dostupné na trhu majú objemy dávkovacích slučiek od 0,2 µl do 2000 µl a môžu byť ovládané elektricky alebo pneumaticky [8, 10, 11, 29].

2. Automatický dávkovač -autosampler

Automatický dávkovač obsahuje zásobníky s vialkami uzavretými pryžovým septom alebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Sekvencia vzoriek aj doba každej analýzy sa dá predom naprogramovať a dávkovanie môže prebiehať bez prítomnosti obsluhy. Obvykle sa dávkuje 2 – 10 µl vzorku. Plnenie slučky a prepínanie polôh ventilov je ovládané pneumaticky alebo elektricky a je riadené počítačom [8, 10, 11, 29].

2.9.2.4 Separácia

Separácia látok v HPLC prebieha v kolóne, ktorej súčasťou je predkolóna.

1. Predkolóna

Zvyšuje stabilitu kolóny, je plnená rovnakým materiálom ako kolóna. Slúži k zachyteniu drobných pevných čiastočiek a nežiadúcich nečistôt vzorku.

2. Kolóna

Kolóna je tvorená z dvoch častí – vlastné telo kolóny, ktorým je rovná trubica s hladkým vnútorným povrchom a koncovka kolóny. Koncovka má zaistiť tesnosť systému v oblasti tlakov používaných v HPLC, distribuovať MF i analyt rovnomerne cez prierez chormatografického lóže a zadržovať náplň kolóny. V kolóne prebieha samotná separácia zložiek analyzovaného vzorku. Dĺžka kolón sa pohybuje od 5 do 30 cm a vnútorný priemer je 2 – 5 mm. Kolóna je nerezová trubice, ktorá je naplnená stacionárnou fázou. Stacionárna fáza sa volí podľa typu chromatografického systému. Ak sa jedná o systém normálnych fáz, tak je stacionárna fáza polárna a mobilná fáza nepolárna. Polárnou stacionárnou fázou je čistý silikagél alebo polárne chemicky viazané fáze na silikagélovom nosiči. Systém s reverznými fázami má naopak stacionárnu fázu nepolárnu a mobilnú fázu polárnu. Nepolárna stacionárna fáza je tvorená dlhými uhlíkovými reťazcami naviazanými na povrchu nosiča (napríklad silikagelu). Menej sa používajú ako stacionárne fáze anorganické nosiče – oxidy kovov ako oxid titaničitý, hlinitý, zirkoničitý. Stacionárna fáza môže byť mikropartikulárna alebo povrchovo porézna. Mikropartikulárne čiastočky majú priemer 3,5 až 5 µm. Povrchovo porézne čiastočky majú pevné inertné jadro a na ňom je nanesená tenká vrstvička stacionárnej fáze. Kolóna i častice náplní kolón musia splňovať určité vlastnosti. Musia mať vysokú selektivitu a dobrú mechanickú a chemickú odolnosť voči vysokým tlakom a zložkám MF, vykazovať vysokú účinnosť separácie látok (nízky výškový ekvivalent teoretického poschodia, H) a klásť malý odpor toku mobilnej fáze. Účinnosť kolóny sa zvyšuje (výškový ekvivalent teoretického poschodia, H výrazne klesá) u náplní s drobnejšími časticami, hlavne pri vyšších prietokoch mobilnej fáze. Pri voľbe optimálnej veľkosti častíc náplne HPLC kolón je treba brať do úvahy účinnosť a pracovný tlak. Pracovný tlak na kolóne sa zvyšuje s rastúcou dĺžkou kolóny. Pórovitosť materiálu pre HPLC kolóny závisí na veľkosti molekúl separovaných látok. Pre separáciu bežných organických látok sú vhodné častice s veľkosťou pórov 5 – 10 µm a špecifickým povrchom 150 – 500 m^2/g [8, 10, 11, 29].

3. Termostat

Účelom termostatu je zaisťovať rovnomernú distribúciu teploty v celom priestore a zabraňovať lokálnym teplotným výkyvom. Termostaty pre HPLC môžeme rozdeliť na teplovzdušné a kvapalinové (olejové). Výhodou kvapalinových termostatov je, že zaisťujú lepší prenos tepla a pracujú s vyššou presnosťou nastavenia teploty. Používajú sa pre teploty vyššie než 100 °C [29].

2.9.2.5 Detekcia

Detektory zaznamenávajú rozdiel v signálu medzi prechodom čistej mobilnej fáze a mobilnej fáze obsahujúcej analyt. Detektory poskytujú signál teda odozvu úmernú koncentrácii, či hmotnosti separovaných látok. Táto odozva sa spracováva počítačom.

I. Rozdelenie detektorov:

1. Nedeštruktívne – nedochádza k chemickej zmene detekovanej zložky,
2. Deštruktívne – detekovaná zložka sa nevratne mení.

II. Rozdelenie detektorov

1) Selektívne - signál je úmerný iba koncentrácii analyzovanej látky v eluáte,

   A. Spektrofotometircký UV – VIS,
   B. Fluorescenčný,
   C. Elektrochemický,
   D. Vodivostný.

2) Univerzálne - poskytujú signál úmerný určitej vlastnosti eluátu ako celku, teda separovanej látky i mobilnej fázy.

   A. Refraktometrický,
   B. Detektor rozptylu svetla.

A. UV – VIS

Spektrofotometrický detektor pracuje v ultrafialovej a viditeľnej oblasti elektromagnetického žiarenia (oblasť vlnových dĺžok 190 – 800 nm). Prítomnosť látky v prietokovej cele, ktorá absorbuje pri určitej vlnovej dĺžke sa prejaví poklesom signálu k signálu v referentnej kyvete, kde je čistá mobilná fáza. Logaritmus pomeru týchto dvoch signálov je rovný absorbancii. Transmitancia je stanovená pomerom intenzity svetla pred a po prechode cez vzorku (viď. Vzťah 10)

$$A = -\log T \tag{10}$$

Podľa Lambertova - Beerova zákona (viď. Vzťah 11) je vyjadrené kvantitatívne stanovenie, teda absorbancia je priamo úmerná koncentrácii látky v mernej cele detektoru. Veľkosť odozvy látky pri danej vlnovej dĺžke charakterizuje molárny absorpčný koeficient.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot L \cdot c \tag{11}$$

kde je A - absorbancia, I_0 - signál v referentnej kyvete, I - signál v prietokovej cele, ε_λ - molárny absorpčný koeficient, L - dĺžka prietokovej cely, c – koncentrácia.

Máme dve varianty. Jednoduchšia varianta je VWD = spektrometer s jednou pevnou prípadne voliteľnou vlnovou dĺžkou a spektrometer s diodovým polom = DAD.

- **VWD** – Princípom tohto typu detektoru je, že sa vyberie jedna vlnová dĺžka a nechá sa tým detektorom prejsť eluát a potom sa meria miera absorpcie. Pozostáva z diódy, ktorá

meria to, čo prešlo a referenčnej diódy, ktorá meria nezoslabený lúč. Porovnaním signálov týchto dvoch diód sa dá určiť miera zoslabenia signálu nezávisle na intenzite dopadajúceho žiarenia. Tento typ detektoru používa ako zdroj žiarenia ortuťovú výbojku.

- **DAD** –Tento typ detektoru je tvorený radou diód a každá tá dióda sníma určitú vlnovú dĺžku, teda okamžite sa dá získať celé spektrum. Každá fotodioda je spojená s kondenzátorom, ktorý je predom nabitý na určitú hodnotu. Fotoelektrický prúd, ktorý vzniká po dopade žiarenia na diodu potom vybije kondenzátor, čo je úmerné intenzite dopadajúceho žiarenia. V ďalšej fázy sú kondenzátory nabité a je meraný prúd, ktorý je potrebný na dobitie príslušných kondenzátorov. Tento typ detektoru je veľmi výhodný, ale cenovo drahý. Výsledkom separácie je trojrozmerný graf, ktorý znázorňuje retenčný čas a vlnové dĺžky. Detektor teda poskytuje v aktuálnom čase, UV spektra pre každý pík na chromatograme a to sa využíva k čiastočnej identifikácie látok [8, 10, 11, 26, 29].

B. Fluorescenčný detektor

Jedná sa o vysoko selektívny a citlivý detektor. Princípom detektoru je fluorescencia a meranie sekundárneho emisného žiarenia, ktoré vydá látka po absorpcii primárneho elektromagnetického excitačnného žiarenia. Žiarenie z budiaceho zdroja prechádza excitačným monochromátorom a dopadá na vzorku. Sekundárne emisné žiarenie sa meria pod uhlom 90 ° k budiacemu žiareniu. Ako zdroj budiaceho žiarenia môže byť použitá ortuťová alebo xenonová výbojka, prípadne laser pre dosiahnutie vysokej citlivosti detekcie [8, 10, 11, 29].

C. Elektrochemický detektor

Elektrochemický detektor je selektívny a citlivý detektor, ktorý poskytuje odozvu pre látky, ktoré môžu byť oxidované alebo redukované. Meria elektrický signál, ktorý je úmerný látkovému množstvu detegovanej zložky. Mernú celu tvorí elektrochemický článok s elektródami, na ktoré je vložené napätie. Počas reakcie dochádza k priechodu prúdu medzi pomocnou a pracovnou elektródou. Medzi elektrochemické detektory radíme napríklad amperometrické a coulometrické detektory [8, 10, 11].

D. Vodivostný detektor

Vodivostný detektor meria elektrickú vodivosť eluátu z kolóny v prietokovej cele z dvoma vzájomne izolovanými kovovými elektródami. Aby nedochádzalo k polarizácii elektród, tak pracuje s vloženým striedavým napätím. Používa sa iba pre detekciu iónových látok pri iónovej chromatografii [8, 10, 11, 29].

A. Refraktometrický

Refraktometrický detektor je najstarší univerzálny detektor. Pri prechode látky mernou celou poskytuje odozvu úmernú rozdielu indexu lomu eluátu v mernej cele a indexu lomu mobilnej fáze v referenčnej cele detektoru. Tento detektor umožňuje detekciu v podstate všetkých látok, ale je menej citlivý, než spektrofotometrické detektory. Jeho odozva závisí na teplote, rýchlosti prietoku a na zložení mobilnej fáze, preto sa v praxi nepoužíva v spojení s gradientovou elúciou [8, 10, 11, 29].

B. Detektor rozptylu svetla

Detektor rozptylu svetla je najnovší a najuniverzálnejší detektor. Má lepšiu citlivosť, než refraktometrický detektor, ale všetky zložky mobilnej fáze musia mať väčšiu prchavosť, než separované látky. Princípom tohto detektoru je, že eluát z kolóny sa sprejom zmlžuje v prúde dusíku za tvorby aerosolu. Tento aerosol putuje do vyhriateho priestoru, kde sa z neho odparí mobilná fáza. Prietokovou celou prechádzajú čiastočky aerosolu vzorku v prúde plynu. Na týchto čiastočkách, dochádza k rozptylu svetla vychádzajúceho z laserového zdroja. Čím viac je čiastočiek aerosolu, tým viac svetla sa rozptýli [8, 10, 11, 29].

2.9.2.6 Riadenie a zber dát

Chromatografický systém obsahuje počítač s príslušným softwarem, ktorý umožňuje vyhodnotiť koncentráciu daných látok. Ďalej umožňuje nastavenie parametrov teploty termostatu, nastavenie dávkovania, prietokov mobilnej fáze atď [10, 11].

2.9.3 Vyhodnotenie výsledkov v HPLC

2.9.3.1 Kvantitatívna analýza

Základom pre kvantitatívne vyhodnotenie sledovanej látky je určenie plochy, respektíve výšky píku. Kvantitatívne vyhodnotenie na základe výšky je používané minimálne, a aj to len u symetrických a úzkych píkov. Určenie neznámej koncentrácie je prevedené porovnaním zo štandardom. Pri kvantitatívnom vyhodnotení sú používané nasledujúce metódy:

1. Metóda vonkajšieho štandardu,
2. Metóda prídavku štandardu,
    a. Metóda jedného prídavku štandardu,
    b. Metóda viac prídavkov štandardu,
    c. Metóda prídavku štandardu za konštantného objemu,
3. Metóda vnútorného štandardu,
    a. Metóda priameho stanovenia,
    b. Metóda kalibračnej krivky,
4. Metóda vnútornej normalizácie [30].

Metóda prídavku štandardu

Princípom tejto metódy je prídavok presného a známeho množstva tej istej látky, u ktorej má byť stanovená neznáma koncentrácia, k analyzovanému vzorku. Metóda prídavku štandardu porovnáva analytický signál vzorku zo signálom získaným po pridaní známych prídavkov štandardu rovnakého druhu ako je stanovovaná látka. Aby mohla byť metóda použitá musí byť splnená podmienka linearity medzi plochou píku a stanovovanou koncentráciou. Má využitie hlavne pri analýzach zložitých vzoriek, kde znižuje riziko vzniku chýb spôsobených napríklad rušivým vplyvom matrice na stanovenie analytu [30].

2.9.3.2 Kvalitatívna analýza

K identifikácii látok v HPLC sú používané retenčné charakteristiky (objem alebo čas). Údaj o retenčnom čase sa dá získať integráciou píku. Čiastočná kvalitatívna informácia sa dá získať

i zo spektier pri použití napríklad detektora diódového poľa. Identifikácia spočíva v porovnaní spektier štandardných látok a spektier neznámych vzoriek meraných pri rovnakých chromatografických podmienkach, prípadne porovnaním s vytvorenou knižnicou spektier [30].

2.9.4 Využitie HPLC

Využíva sa k identifikácii zložiek vzorku a stanovení ich obsahu pri analytických separáciách. Na rozdiel od ostatných separačných technik HPLC umožňuje separáciu širokého spektra kvapalných a tuhých látok rôznej polarity a molekulárnych hmotností. Je to dané veľkým výberom možných kombinácii rôznych stacionárnych a mobilných fáz i detekčných metód. V potravinárskom priemysle sa HPLC využíva samostatne, ale aj ako kombinácia s imunometódami, mikrobiálnymi metódami a metódami enzýmovej analýzy. Je možné stanoviť prídavné látky ako sú antioxidanty, chemické konzervačné látky, farbivá, vonné a chuťové látky, povzbudzujúce látky, látky na úpravu fyzikálnych vlastností potravín, technologické pomocné látky. Techniky úpravy vzorky ako je extrakcia na pevnej fázi alebo superkritická fluidná extracia zvyšujú citlivosť HPLC analýzy až na hladiny ppb (parts per billion) alebo ppt (parts per trillion) [8, 10, 11, 12].

2.9.5 Možnosti úpravy vzorku pred chromatografickou analýzou

Cieľom úpravy vzorku je izolácia a zakoncentrovanie analytov, prečistenie extraktov a odstránenie balastných látok, ktoré môžu interferovať zo sledovanými analytmi. Kvalita úpravy vzorku ovplyvňuje nasledujúcu prácu so vzorkou a je časovo najnáročnejším krokom. Metódy úpravy vzorku sa delia podľa historického vývoja na konvenčné a moderné. Konvenčné spôsoby sú charakteristické viackrokovou úpravou vzorku a vysokou spotrebou rozpúšťadiel aj vzorku.

Medzi konvenčné metódy patrí:

1. Priama extrakcia a úprava extraktu,
2. Extrakcia na tuhú fázu (SPE),
3. Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE),
4. Zrážanie proteínov (PP) [30].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo zoznámenie sa s metódami stanovenia organických kyselín v alkoholických nápojoch (CITP, HPLC/UV). V rámci práce boli riešené nasledujúce čiastkové úlohy:

1. Optimalizácia metód stanovenia,
2. Analýza reálnych vzoriek 11 pív dostupných v obchodných reťazcoch,
3. Porovnanie výsledkov oboch metód,
4. Porovnanie zhôd medzi vzorkami navzájom,
5. Porovnanie výsledkov s dostupnou literatúrou.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 I. metóda stanovenia organických kyselín v pive (CITP)

4.1.1 Laboratórne vybavenie a prístroje

- Elektroforetický analyzátor EA 101 (villa Labeco s.r.o. Spišská nová Ves, SR) zo softwarem ITPwin ver. 2.31 (KasComp Computer Applications spol. s.r.o. Bratislava, SR),
- Analytické váhy Sartorius research s přesností na 0,0001 g (Nemecko),
- Ultrazvuková kúpeľ Bandelin Sonorex,
- Laboratórne sklo - odmerné banky (Simax, ČR), kádinky,
- Mikropipety 100 – 1000 µl (Finnpipette F2 - Thermo scientific - Fínsko),
- Automatické pipety 0,5 – 5 ml (Finnpipette F2 - Thermo scientific - Fínsko),
- Injekčné striekačky značky Chirana (2,5; 3; 5; 10 ml),
- Plastové kelímky,
- Špičky,
- Chladnička a mraznička k uchovávaniu vzoriek,
- Parafilm.

4.1.1.1 Parametre elektroforetického analyzátoru EA 101

Elektroforetický analyzátor obsahuje dve kolóny a to hornú (predseparačnú) a dolnú (analytickú). Na hornej kolóne sa nachádza vodivostný detektor a na dolnej kolóne vodivostný a UV detektor. Namerané data boli spracované a analyzované na vodivostnom detektore. Vlastnosti elektroforetického analyzátora EA 101 a parametre našeho merania udáva Tab. 5.

Tab. 5: Vlastnosti analyzátora a parametre merania.

Dĺžky kapilár predseparačných kólon	90 – 160 mm
Vnútorný priemer kapilár predseparačných kolón	0,8 mm
Dĺžky kapilár analytických kolón	90 – 160 mm
Vnútorný priemer kapilár analytických kolón	0,3 mm
Objem dávkovacieho kohútu	30 µl
Maximálne napätie	8000 V
Maximálny prúd predseparačnej kolóny	250 µA
Maximálny prúd analytickej kolóny	50 µA
Príkon separačnej jednotky	50 VA
Rýchlosť snímania dát	20 vzoriek/s
Mód merania	ITP
Polarita	anióny
Počet krokov analýzy	5
Doba analýzy jedného vzorku	35 minút

4.1.2 Použité chemikálie

Názov	Vzorec	Výrobca, krajina pôvodu
Kyselina mliečna	$C_3H_6O_3$	(Fluka, Japonsko)
Kyselina šťaveľová	$C_2H_2O_4$	(Fluka, Nemecko)
Kyselina jantarová	$C_4H_6O_4$	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Kyselina citrónová	$C_6H_8O_7$	(Fluka, Rakúsko)
Kyselina octová	$C_2H_4O_2$	(Honeywell Fluka, Nemecko)
Kyselina benzoová	$C_6H_5CO_2H$	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Deionizovaná voda	H_2O	(VÚPS, ČR)
Etanol	C_2H_6O	(Merck, Nemecko)
Kyselina chlorovodíková	HCl	(Sigma Aldrich, Rakúsko)
Kyselina kapronová	$CH_3\ (CH_2)_4CO_2H$	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Histidín	$C_6H_9N_3O_2$	(Sigma Aldrich, Japonsko)
BIS-TRIS Propán	$C_{11}H_{26}N_2O_6$	(Sigma Aldrich, USA)
Methyl 2-hydroxyethyl celulóza	MHEC	(Sigma Aldrich, USA)

4.1.3 Vzorky

Metódou kapilárnej izotachoforézy bolo analyzovaných 11 vzoriek pív, dostupných v obchodných reťazcoch. Zoznam vzoriek je uvedený v Tab. 6. Zo sady 11 pív bolo 1 pivo alkoholické a 10 nealkoholických, 8 ležiakov a 3 výčapné pivá, 10 svetlých a 1 tmavé.

Tab. 6: Zoznam analyzovaných vzoriek pív.

č. vzorky	Charakteristika	Obsah alkoholu [obj. %]	Krajina pôvodu
1	bezlepkový svetlý ležiak	4,9	ČR
2	nealkoholický svetlý ležiak	max 0,5	ČR
3	nealkoholický svetlý ležiak	max 0,5	ČR
4	nealkoholický polotmavý ležiak	max 0,5	ČR
5	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
6	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
7	nealkoholický svetlý l ležiak	max. 0,49	ČR
8	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
9	nealkoholické svetlé v plechovke	0,49	Holandsko
10	nealkoholické svetlé v plechovke	0,00	ČR
11	nealkoholické svetlé v plechovke	max 0,5	ČR

4.1.3.1 Úprava vzorky

Vzorku piva bolo nutné pred analýzou odpeniť v ultrzvukom kúpeli v 3 cykloch po dobu 10 minút a následne nechať odstáť, kým pena úplne nezmizne. Potom bola vzorka piva neriedená päť krát deionizovanou vodou. Takto upravená vzorka bola pripravená na analýzu.

4.1.4 Príprava roztokov

Zloženie koncového a vodiaceho elektrolytu bolo zvolené na základe pH analyzovaných látok.

4.1.4.1 Príprava vodiaceho elektrolytu

Bolo navažované 1000 mg histidínu, 355 mg BIS – TRIS Propanu, 500 mg methyl-hydroxyethylcelulozy a kvantitatívne prevedené do 500 ml kadičky. Kadička bola doplnená do objemu 400 ml deionizovanou vodou. Na záver bolo napipetované 400 µl 35 % HCl. Kadička bola následne umiestnená na automatické miešadlo, kde sa nechala miešať do dôkladného rozpustenia všetkých komponent. Po rozpustení bolo nutné zakryť kadičku alobalom a nechať chladiť v chladničke do druhého dňa. Po 24 h odležania bol roztok kvantitatívne prevedený do 500 ml odmernej banky a doplnený po rysku deionizovanou vodou.

4.1.4.2 Príprava koncového elektrolytu

Bolo navážené 0,388 g histidínu a kvantitatívne prevedené do 500 ml kadičky. Následne bola kadička doplnená vodou do objemu 400 ml a na záver bolo napipetované 315 µl kyseliny kapronovej. Potom bola kadička položená na automatické miešadlo a miešaná do rozpustenia komponent. Po rozpustení, ktoré trvalo približne 20 minút, bol roztok kvantitatívne prevedený do 500 ml odmernej banky a doplnený po rysku deionizovanou vodou.

4.1.4.3 Príprava zásobných roztokov organických kyselín

Zásobné roztoky jednotlivých organických kyselín boli pripravené navážením potrebného množstva organickej kyseliny do kadičky. Po rozpustení v kadičke a kvantitatívnom prevedení do odberných baniek o objeme 100 ml, bola banka doplnená po rysku deionizovanou vodou. Navážky a príslušné koncentrácie organických kyselín sú uvedené v Tab. 7. Takto pripravený zásobný roztok každej zo 6 organických kyselín bol zriedený 10 krát a odpovedal 5 bodu kalibrácie.

Tab. 7: Hodnoty pre prípravu zásobných roztokov organických kyselín.

Názov kyseliny	Navážky [mg]	Koncentrácia [mg/l]	Koncentrácia 10x zriedený [mg/l]
mliečna	184,7	1847	184,7
šťaveľová	23,0	230	23,0
citrónová	36,0	360	36,0
octová	44,0	440	44,0
jantárová	36,2	362	36,2
benzoová	302,1	3021	302,1

4.1.4.4 Príprava kalibračných roztokov organických kyselín

Kalibračné štandardy jednotlivých organických kyselín boli pripravované riedením zo zásobného roztoku (10 krát zriedeného) na koncentrácie, ktoré boli očakávaná v pive. Štandardy 1 – 5 všetkých 6 organických kyselín boli pripravované do objemu 2 ml riedením uvedeným v Tab. 8.

Tab. 8: Hodnoty pre prípravu kalibračných roztokov.

Č. štandardu	Riedenie	Objem štandardu [µl]	Objem vody [µl]
1	10,0	200	1800
2	5,0	400	1600
3	3,3	600	1400
4	2,0	1000	1000
5	1,0	2000	0

4.1.4.5 Príprava roztokov pre štandardný prídavok (príprava mixu)

Štandardný prípravok bol pripravovaný za účelom presnejšieho určenia zón jednotlivých organických kyselín vo vzorkách piva. Pripravoval sa do 5 ml, kde 1 ml predstavovala vzorka piva a 4 ml tvoril štandard danej organickej kyseliny pripravený 10 násobným riedením zásobného roztoku odpovedajúcej organickej kyseliny. Štandard teda odpovedal 5 bodu kalibrácie.

4.1.4.6 Príprava zmiešaného štandardu

Boli pripravené zásobné roztoky všetkých 6 organických kyselín, rovnakým postupom ako je uvedené v kapitole 4.1.4.3. Z každého zásobného roztoku pre každú z kyselín bol odobratý 1 ml do 10 ml odmernej banky a následne bola odmerná banka doplnená po rysku deionizovanou vodou. Takto pripravený zmiešaný štandard obsahoval všetkých 6 organických kyselín o koncentráciách 10x zriedených oproti pripraveným zásobným roztokom. Koncentrácie organických kyselín v zmiešanom štandarde sú uvedené v Tab. 9.

Tab. 9: Hodnoty koncentrácie organických kyselín v zásobných roztokoch a zmiešanom štandarde.

Názov kyseliny	Koncentrácia [mg/]	Koncentrácia 10x zriedený [mg/]
mliečna	1895	189,5
šťaveľová	239	23,9
citrónová	330	33,0
octová	280	28,0
jantárová	350	35,0
benzoová	302	30,2

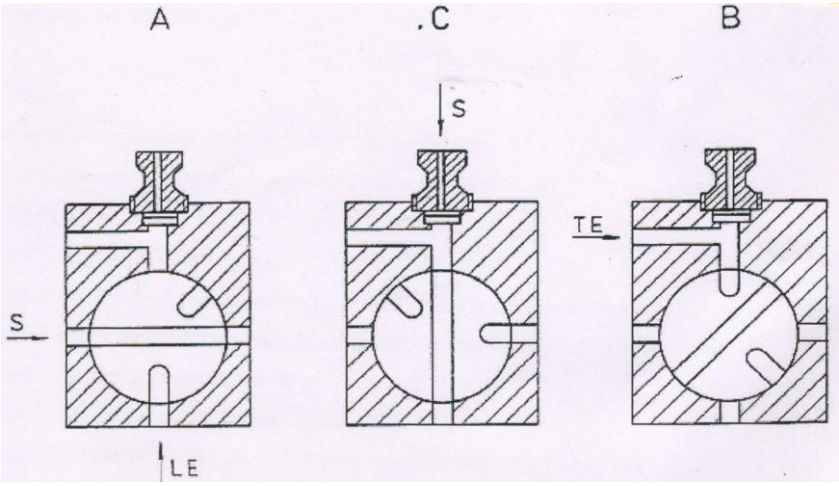
4.1.5 Analýza piva pomocou CITP

4.1.5.1 Postup merania

1. Pred začiatkom merania sa rezervoáre CE 1 a CE 2 pre vodiaci elektrolyt a rezervoár TE pre koncový elektrolyt naplnia príslušnými roztokmi a následne sa z nádobiek vysajú pomocou striekačky s hadičkou.
2. Potom sa nádobky naplnia znovu príslušnými roztokmi vodiaceho a koncového elektrolytu a uzavrú sa šroubovacími uzávery.
3. Vodiaci elektrolyt sa naplní do injekčnej striekačky z *In column 1* a *In column 2* a premyje sa postupne horná i dolná kolóna vodiacim elektrolytom.

4. Prevedie sa nástrik terminálu a spustí sa analýza (dávkovanie viď. Obr. 8).
5. Po dobehnutí merania terminálu sa prevedie analýza štandardu príslušnej organickej kyseliny. Tým sa zabezpečí čisté pozadie a kontrola výsledku s výsledkom z kalibračnej krivky.
6. Nakoniec sa zmeria vzorka piva.
7. Medzi meraniami jednotlivých vzoriek sa obe kolóny premývajú roztokom vodiaceho elektrolytu. Hlavným cieľom tohto kroku je odstrániť vzduchové bubliny z aparatúry a vyčistiť celý prístroj pred analýzou ďalšieho vzorku, aby nedochádzalo k interferenciám.

4.1.5.2 Postup dávkovania vzorku



Obr. 8: Polohy dávkovača vzorku [34].

Dávkovací kohút na dávkovanie vzorku uvedený na Obr. 8 má 3 polohy. Poloha A - plnenie vzorku; Poloha B – prípravná pozícia, v ktorej sa z rezervoára koncového elektrolytu vypustí časť tohto roztoku do odpadu; Poloha C - pracovná poloha počas bežania analýzy [26, 34].

4.1.5.3 Postup čistenia po skončení analýzy

Po skončení celého merania sa elektroforetický analyzátor čistí a to nasledovným postupom:

1. Vysajú sa roztoky vodiaceho a koncového elektrolytu z príslušných nádob,
2. Do rezervoárov koncového a vodiaceho elektrolytu sa naleje deionizovaná voda a niekoľko krát vysaje,
3. Potom sa rezervoáre koncového a vodiaceho elektrolytu znovu naplnia deionizovanou vodou a uzavrú. Pomocou vývevy sa prevedie najskôr preplach okruhu hornej predseparacnej kolóny a následne dolnej analytickej kolóny,
4. Nakoniec sa voda z rezervoárov vysaje a prístroj sa nechá vysušiť.

4.2 II. metóda stanovenia organických kyselín v pive (HPLC/UV)

4.2.1 Laboratórne vybavenie a prístroje

- Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Dionex,) s UV a fluorescenčným detektorom a softwarem Chromeleon. Parametre a podmienky analýzy na chromatografe Ultimate 3000 sú uvedené v Tab. 10,
- Kolóna Synergi Hydro - RP (Phenomenex) – kolóna je stabilná v 100 % vodných fázach. Funguje na polárnych, vodíkových, elektrostatických interakciách a vďaka tomu má schopnosť hydrofóbnej i polárnej retencie,
- Analytické váhy Sartorius research s presnosťou na 0,0001 g,
- Predvážky Sartorius s presnosťou na 0,01 g,
- Ultrazvuková kúpeľ Bandelin Sonorex,
- pH meter InoLab pH level 2,
- Rotační miešadlo,
- Laboratórne sklo - Odmerné banky (Simax, ČR),
- Mikropipety 100 – 1000 µl (Finnpipette F2 - Thermo scientific, Fínsko),
- Mikropipety 10 – 100 µl (Transferpette – Brand - Nemecko),
- Automatické pipety 0,5 – 5 ml (Finnpipette F2 - Thermo scientific, Fínsko),
- Príslušné špičky na mikropipety a automatické pipety,
- Sklenená pipeta 2 ml (Qualicolor, ČR),
- Kolónky Discovery DSC – SAX 3ml 500 mg - Supelco, USA),
- Chladnička a mraznička k uchovávaniu vzoriek,
- Parafilm,
- Sklenené vialky 12 x 32 mm, objem 2 ml (Chromservis, ČR),
- Krimpovacie uzávery na vialky (Agilent),
- Krimpovacie kliešte.

Tab. 10: Parametre chromatografického systému.

Typ HPLC	Na obrátených fázach
Stacionárna fáza	Silikagel s naviazanou C18, plne porézne častice o veľkosti 4 µm a veľkosti pórov 80 A
Kolóna	Synergi 4µm Hydro-RP 80A, dĺžka 150 a vnútorný priemer 3.0 mm
Prietok MF	0,35 ml/min
Zloženie MF	99 % 0,05 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (pH = 2,1; H_3PO_4)+ 1 % acetonitril
Teplota	30 °C
Detektor	UV – VIS (210 nm)
Objem nástriku	1 µl
Elúcia	Izokratická
Odplynenie	Vákuový odplyňovač
Čerpadlo	Izokratické piestové

4.2.2 Použité chemikálie

Názov	Vzorec	Výrobca, krajina pôvodu
Kyselina mliečna	$C_3H_6O_3$	(Fluka, Japonsko)
Kyselina šťaveľová	$C_2H_2O_4$	(Fluka, Nemecko)
Kyselina jantarová	$C_4H_6O_4$	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Kyselina citrónová	$C_6H_8O_7$	(Fluka, Rakúsko)
Kyselina octová	$C_2H_4O_2$	(Honeywell Fluka, Nemecko)
Acetonitril	C_2H_3N	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Methanol	CH_3OH	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Dihydrogénfosforečnan sodný monohydrát	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	(Sigma Aldrich, Nemecko)
Hydroxid sodný	NaOH	(Sigma Aldrich, Švédsko)
Kyselina sírová	H_2SO_4	(Penta, ČR)
Kyselina fosforečná	H_3PO_4	(Lach –Ner, ČR)
Deionizovaná voda	H_2O	(VÚPS, ČR)
Etanol	C_2H_6O	(Merck, Nemecko)
Kyselina chlorovodíková	HCl	(Sigma Aldrich, Rakúsko)

4.2.3 Vzorky

Metódou HPLC/UV bolo analyzovaných 11 vzoriek pív, dostupných v obchodných reťazcoch. Zoznam vzoriek je uvedený v Tab. 11. Zo sady 11 pív bolo 1 pivo alkoholické a 10 nealkoholických, 8 ležiakov a 3 výčapné pivá, 10 svetlých a 1 tmavé.

Tab. 11: Zoznam analyzovaných vzoriek pív.

č. vzorky	Charakteristika	Obsah alkoholu [obj. %]	Krajina pôvodu
1	bezlepkový svetlý ležiak	4,9	ČR
2	nealkoholický svetlý ležiak	max 0,5	ČR
3	nealkoholický svetlý ležiak	max 0,5	ČR
4	nealkoholický polotmavý ležiak	max 0,5	ČR
5	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
6	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
7	nealkoholický svetlý l ležiak	max. 0,49	ČR
8	nealkoholický svetlý ležiak	0,50	ČR
9	nealkoholické svetlé v plechovke	0,49	Holandsko
10	nealkoholické svetlé v plechovke	0,00	ČR
11	nealkoholické svetlé v plechovke	max 0,5	ČR

4.2.3.1 Úprava vzorky pred analýzou HPLC/UV

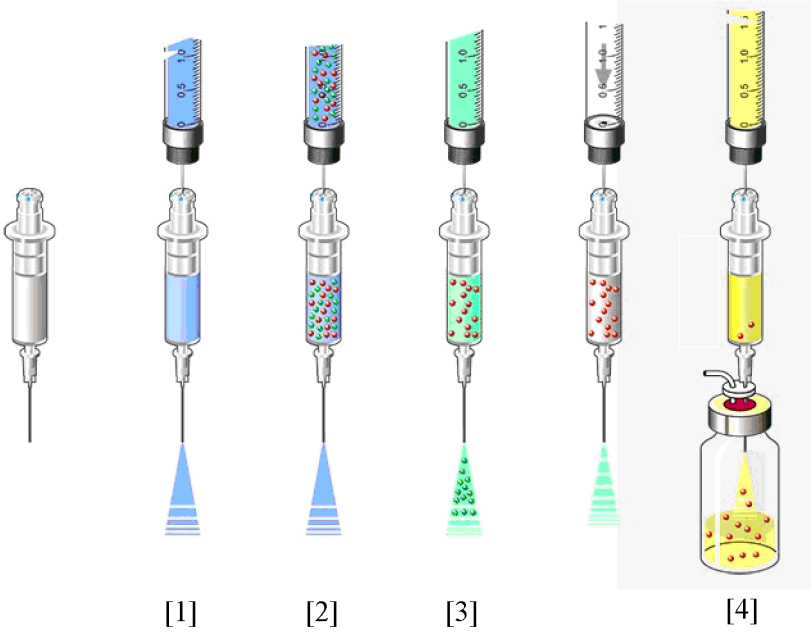
Vzorku piva bolo nutné pred analýzou odpeniť v ultrzvukom kúpeli v 3 cykloch po dobu 10 minút a následne nechať odstáť, kým pena úplne nezmizne. Potom bola vzorka piva neriedená dva krát deionizovanou vodou. Pred SPE extrakciou bolo u takto nariedeného piva upravené pH roztokom 0,1 M NaOH na hodnotu 9.

SPE – extrakcia na pevnej fázy

Princípom je extrakcia analytu rozdeľovaním, či inou interakciou medzi tuhou fázou (extrakčná kolónka) a kvapalnou fázou (vzorka obsahujúca analyt). Pre úspešnosť extrakcie musí mať analyt vyššiu afinitu k tuhej fázy, než k matrici vzorku. Retencia môže nastať na základe polárnych, nepolárnych, iónových i afinitných interakcii. SPE je najbežnejšou metódou úpravy vzorku pred chromatografickou analýzou [30, 31, 32].

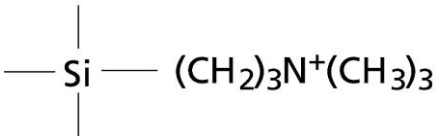
Obecný postup extrakcie SPE sa skladá z nasledujúcich krokov a je uvedený na Obr. 9:

1. Kondicionácia kolónky,
2. Nanesenie vzorku,
3. Premytie kolónky,
4. Elucia analytu [30, 31].



Obr. 9: Postup extrakcie na tuhú fázu [30].

Pre absorpciu slabých aniónov a ich odstránenie z matrice sa používa extrakcia na silnom anexu. Ako nosič je použitý silikagél a funkčnú skupinu tvorí polymericky viazaný kvartérny amín.



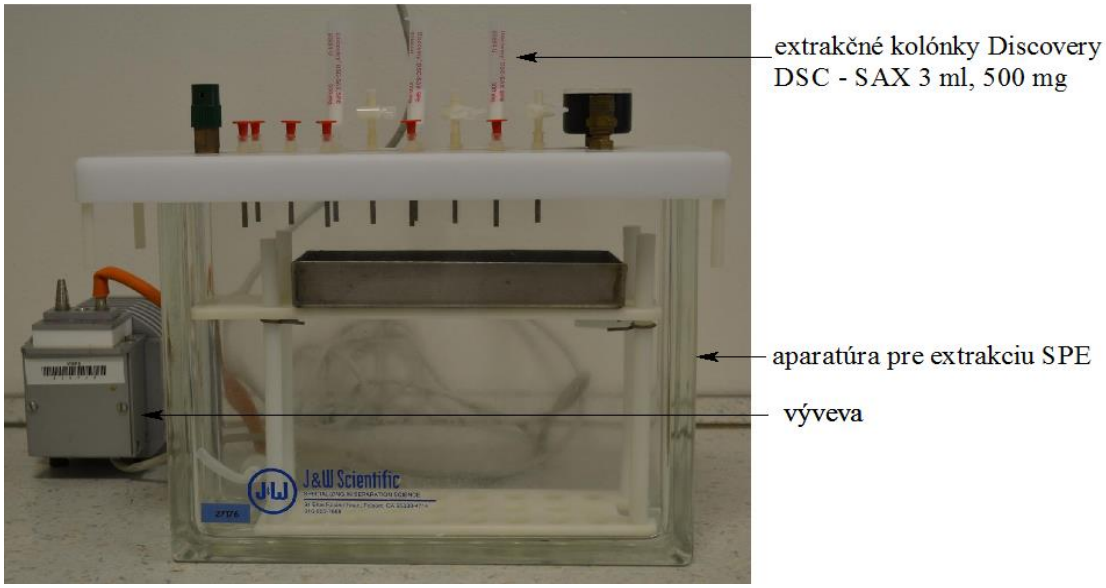
Primárnym mechanizmom retencie sú elektrostatické, teda iónové interakcie funkčných skupín analytov a opačne nabitých funkčných skupín na sorbente. Pri vývoji metódy je dôležitá kapacita kolónky. Pri vysokej kapacite by separácia nebola účinná. Kapacita kolónky odpovedá 5 % hmotnosti sorbentu. Veľkosť kolónky sa volí podľa minimálneho elučného objemu. Najbežnejší rozmer SPE koloniek je 3 ml. Aby nastalo elektrostatické zadržanie tak funkčné skupiny látky aj sorbentu musia byť v ich ionizovanej forme. To sa zabezpečí prostredníctvom

prísnej kontroly pH matrice vzorky. Pri použití anexu musíme upraviť pH vzorku ešte pred extrakciou pomocou NaOH na pH = 9. Pri tejto hodnote pH sú slabé organické kyseliny disociované z viac než 99 % a sú kvantitatívne zadržované na sorbente [30, 31, 32].

Postup pre extrakciu na pevnej fázy, použitý v tejto diplomovej práci bol nasledujúci:

1. Kondicionácia 3 ml metanolu,
2. Aktivácia 2 ml 1 M HCl,
3. Aplikácia 2 ml vzorku,
4. Premytie 3 ml vody,
5. Elúcia 1 ml 0,05 M H_2SO_4 (2 krát zachytávanie priamo do vialiek).

Extrakcia na pevnej fázy prebiehala na aparatúre uvedenej na Obr. 10.



Obr. 10: Aparatúra pre extrakciu.

4.2.4 Príprava roztokov

4.2.4.1 Príprava 0,05 M dihydrogénfosforečnanu sodného monohydrátu

Na prípravu pufru bolo navážené 3,45 g dihydrogénfosforečnanu sodného monohydrátu do 500 ml kadičky a doplnené po rysku deionizovanou vodou. Potom bolo upravené pH na hodnotu 2,1 pomocou kyseliny fosforečnej. Následne bol roztok prefiltrovaný pomocou filtračnej aparatúry cez nylonový membránový filter o priemere 47 mm a veľkosti pórov 0,45 µm.

4.2.4.2 Príprava 0,05 M kyseliny sírovej

Do odmernej banky o objeme 100 ml bolo napipetované 268 µl kyseliny sírovej 98 % a následne bola odmerná banka doplnená po rysku deionizovanou vodou.

4.2.4.3 Príprava 1 M kyseliny chlorovodíkovej

Do odmernej banky o objeme 500 ml bolo napipetované 41,4 ml 37 % kyseliny chlorovodíkovej a následne bola odmerná banka doplnená po rysku deionizovanou vodou.

4.2.4.4 Príprava 0,1 M NaOH

Na prípravu 0,1 M hydroxidu sodného bolo navážené 0,8 g NaOH do 50 ml kadičky, doplnené deionizovanou vodou. Po rozpustení bol roztok kvantitatívne prevedený z kadičky do 200 ml odmernej banky a následne bola odmerná banka doplnená po rysku deionizovanou vodou.

4.2.4.5 Príprava 50 % - ného NaOH

Bolo navážené 50 g hydroxidu sodného do kadičky a po doplnení deionizovanou vodou a rozpustení, bol roztok kvantitatívne prevedený z kadičky do 100 ml odmernej banky. Potom bola odmerná banka doplnená po rysku deionizovanou vodou.

4.2.5 Príprava štandardných roztokov organických kyselín

4.2.5.1 Príprava zmiešaného štandardu

Zásobný štandardný roztok bol pripravený navážením 5 organických kyselín do 100 ml odmernej banky a doplnený po rysku vodou. Koncentrácie štandardov organických kyselín odpovedali 10 krát vyšším koncentráciám, než aké boli očakávané v pive. Hodnoty navážok a koncentrácii pre zmiešaný štandard sú uvedené v Tab. 12.

Tab. 12:Hodnoty navážok a koncentrácií pre zmiešaný štandard.

Názov kyseliny	Navážka [g]	Koncentrácia [g/l]
mliečna	0,3017	3017
šťaveľová	0,0205	205
citrónová	0,0505	505
octová	0,1031	1031
jantárová	0,0500	500

4.2.5.2 Príprava mixu 2x viac

Na prípravu štandardného prídavku 2 krát viac bola vzorka piva o objeme 5 ml doplnená 1 ml zásobného roztoku zmiešaného štandardu 5 organických kyselín. Následne bolo u štandardného prídavku 2 x viac upravené pH pomocou 0,1 M NaOH na hodnotu pH = 9. Takto upravený štandardný prídavok bol podrobený extrakcii na pevnú fázu SPE a následne zanalyzovaný pomocou HPLC/UV.

4.2.5.3 Príprava mixu 5x viac

Na prípravu štandardného prídavku 5 krát viac bol použitý zásobný roztok zmiešaného štandardu 5 organických kyselín v objeme 4 ml a k tomu bolo pridané 5 ml vzorku piva. Následne bolo u štandardného prídavku 5 x viac upravené pH pomocou 0,1 M NaOH na hodnotu pH = 9. Takto upravený štandardný prídavok bol podrobený extrakcii na pevnú fázu SPE a následne zanalyzovaný pomocou HPLC/UV.

4.2.5.4 Príprava vzorky pre stanovenie matricového efektu

Vzorka piva bola nariedená deionizovanou vodou 1:1 do 200 ml kadičky a následne bolo upravené pH pomocou 50 % - ného NaOH na hodnotu pH = 9. Takto upravená vzorka bola podrobená extrakcii na pevnú fázu SPE na 6 kolónkach. V tomto prípade bola pre analýzu HPLC/UV dôležitá iba elúcia č. 2.

4.2.5.5 Príprava kalibrácie do matrice

Pre prípravu kalibrácie do matrice sme postupovali riedením vzorky pripravenej na stanovenie matricového efektu v kapitole 4.2.5.4. Vzorka sa riedila vodou a zmiešaným štandardom. Kalibrácia bola tvorená z 5 bodov vždy do objemu 1 ml a 6 bod predstavoval blank obsahujúci iba matricu (viď. Tab. 13).

Tab. 13: hodnoty pre prípravu kalibrácie do matrice.

Č. vzorky	Riedenie	Objem matrice [ml]	Objem vody[ml]	Objem štandardu [ml]
1	100	0,50	0,49	0,01
2	20	0,50	0,45	0,05
3	10	0,50	0,40	0,1
4	5	0,50	0,30	0,2
5	1	0,50	0	0,5
6	-	0,50	-	-

4.2.6 Analýza a detekcia piva pomocou HPLC/UV

Pre analýzu organických kyselín vo vzorkách piva bola zvolená HPLC kolóna Synergi Hydro - RP o rozmeroch 150 x 3,0 mm. Podmienky analýzy sú uvedené v Tab. 10. Detekcia separovaných látok prebiehala pomocou detektoru s diódovým polom pri vlnovej dĺžke 210 nm, pri ktorej absorbuje všetkých 5 stanovovaných organických kyselín.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovenie organických kyselín pomocou CITP

K analýze organických kyselín pomocou izotachoforézy bolo podrobených všetkých 11 vzoriek pív. Výsledky u jednotlivých vzoriek pív sú uvedené ako priemerné hodnoty dvoch paralelných stanovení zón, RSH a koncentrácií a nachádzajú sa v Tab. 14 až Tab. 24. Koncentrácie organických kyselín vo vzorkách pív boli vypočítané softwarem ITPwin na základe kalibračných kriviek. Izotachoforegramy pre všetkých 11 vzoriek pív sú uvedené v prílohách viď. Obr. 26 - Obr. 36.

Tab. 14: Výsledky analýzy organických kyselín vzorku č. 1.

číslo vzorky	**1**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	84,72	0,417	597,3233
šťaveľová	0,55	0,153	N.D.
jantárová	11,55	0,330	45,2700
citrónová	23,00	0,332	119,0050
octová	33,03	0,461	94,3700
benzoová	36,13	0,563	190,1117

Tab. 15: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 2.

číslo vzorky	**2**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	78,56	0,451	549,6138
šťaveľová	1,20	0,157	N.D.
jantárová	5,15	0,323	20,6275
citrónová	16,85	0,344	86,7450
octová	37,45	0,465	109,8750
benzoová	24,13	0,599	126,9013

Tab. 16: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 3.

číslo vzorky	**3**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	73,87	0,487	513,2340
šťaveľová	3,63	0,151	4,5200
jantárová	4,58	0,354	18,4125
citrónová	20,28	0,334	104,7100
octová	32,28	0,487	91,7425
benzoová	26,85	0,654	141,2450

Tab. 17: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 4.

číslo vzorky	**4**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	56,63	0,452	379,5563
šťaveľová	4,70	0,151	7,1225
jantárová	4,30	0,362	17,3550
citrónová	20,85	0,334	107,7275
octová	34,75	0,496	100,4125
benzoová	29,63	0,628	155,8525

Tab. 18: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 5.

číslo vzorky	**5**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	104,97	0,496	754,2983
šťaveľová	4,48	0,152	6,5750
jantárová	3,35	0,350	13,6975
citrónová	14,78	0,342	75,8625
octová	31,68	0,490	89,6400
benzoová	25,30	0,614	133,0875

Tab. 19: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 6.

číslo vzorky	**6**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	61,26	0,484	415,5038
šťaveľová	1,05	0,166	N.D
jantárová	2,90	0,366	11,9625
citrónová	16,90	0,378	87,0100
octová	27,30	0,491	74,3100
benzoová	26,28	0,643	138,2200

Tab. 20:Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 7.

číslo vzorky	**7**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	88,13	0,475	623,8075
šťaveľová	2,43	0,159	1,6125
jantárová	1,93	0,313	8,2075
citrónová	14,53	0,291	74,5525
octová	27,08	0,499	73,5225
benzoová	25,48	0,544	134,0075

Tab. 21: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 8.

číslo vzorky	**8**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	85,05	0,491	599,9050
šťaveľová	4,18	0,164	5,8525
jantárová	1,48	0,315	6,4750
citrónová	10,13	0,385	51,4725
octová	24,60	0,472	64,8525
benzoová	26,85	0,660	141,2450

Tab. 22: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 9.

číslo vzorky	**9**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	77,48	0,526	540,6800
šťaveľová	1,53	0,185	N.D.
jantárová	4,05	0,329	16,3925
citrónová	9,65	0,388	48,9800
octová	27,93	0,445	76,5000
benzoová	12,35	0,671	64,9225

Tab. 23: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 10.

číslo vzorky	**10**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	59,75	0,493	403,7800
šťaveľová	2,10	0,145	0,8250
jantárová	8,95	0,326	35,2575
citrónová	23,15	0,327	119,7925
octová	19,63	0,454	47,4200
benzoová	31,20	0,668	164,1425

Tab. 24: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 11.

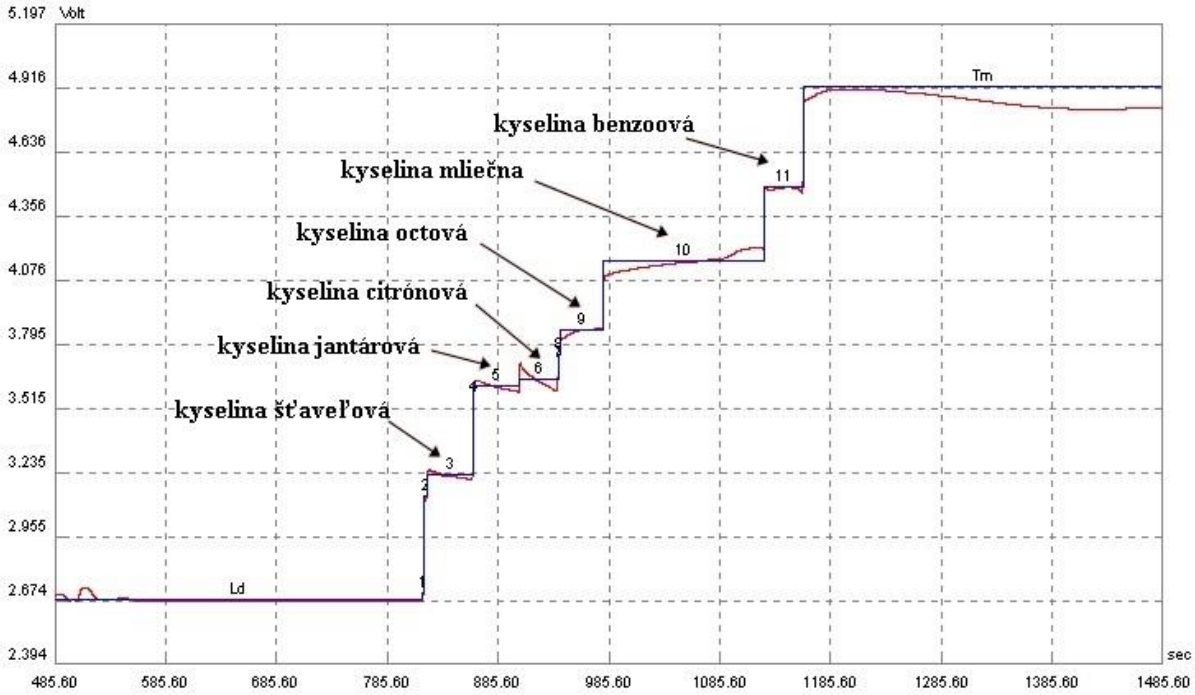
číslo vzorky	**11**		
Názov kyseliny	**Zóna**	**RSH**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	58,96	0,485	397,6570
šťaveľová	1,38	0,143	0,3425
jantárová	2,60	0,350	10,8075
citrónová	25,33	0,383	131,2000
octová	31,43	0,514	88,765
benzoová	20,65	0,644	108,6125

5.1.1 Analýza zmiešaného štandardu

Pomocou izotachoforézy bol analyzovaný zmiešaný štandard obsahujúci všetkých 6 organických kyselín. Výsledné hodnoty analýzy pre jednotlivé kyseliny sú uvedené v Tab. 25. Výsledkom izotachoforetickej analýzy je izotachoforegram uvedený na Obr. 11.

Tab. 25: Výsledné hodnoty namerané pre zmiešaný štandard.

Názov kyseliny	Zóna	RSH	Koncentrácia [mg/l]
mliečna	142,53	0,655	209,0900
šťaveľová	40,93	0,235	18,9680
jantárová	40,98	0,410	31,7160
citrónová	34,40	0,420	35,7595
octová	38,23	0,518	22,5175
benzoová	32,60	0,800	35,8815



Obr. 11: Izotachoforegram zmiešaného štandardu.

5.1.2 Štatistické spracovanie výsledkov z CITP

Validácia je proces, ktorým si potvrdíme, že náš zvolený postup je vhodný a správny pre získanie relevantných výsledkov.

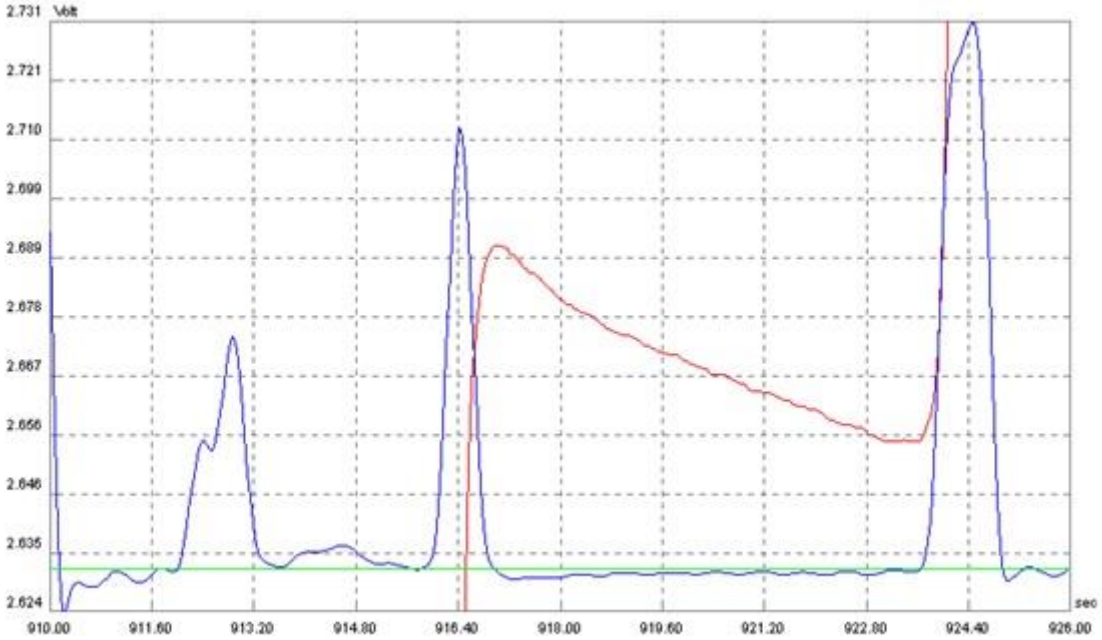
5.1.2.1 Medza stanovitelnosti (kvantifikácie) - LOQ

Odpovedá koncentrácii, pri ktorej presnosť a správnosť stanovenia dovoľuje kvantitatívne vyhodnotenie [30]. Pri stanovení medze detekcie u izotachoforézy sa postupuje odčítaním rozsahu času na ose *x* medzi dvoma píkmi charakterizujúcimi rozsah zóny pre danú kyselinu.

Tento rozsah odpovedá dĺžke zóny, teda koncentrácii pre danú kyselinu. Medze kvantifikácie určené pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 26.

Ako príklad uvádzam získanie hodnoty LOQ pre kyselinu citrónovú.

LOQ = 924,4 – 916,4 = 8 s.....2,872 mg/l ...táto koncentrácia odpovedá štandardu č. 1 z kalibračnej krivky pre kyslinu citrónovú. Grafické znázornenie odčítania hodnoty LOQ pre kyselinu citrónovú je uvedené na Obr. 12.



Obr. 12: Príklad vyhodnotenia medze kvantifikácie pre kyselinu citrónovú.

5.1.2.2 Medza detekcie - LOD

Odpovedá koncentrácii, pre ktorú je analytický signál štatisticky významne odlišný od šumu [30]. Medze detekcie pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 26.

Ako príklad uvádzam výpočet medze detekcie pre kyselinu citrónovú. Medzu detekcie získame z medze kvantifikácie a to jednoduchou trojčlenkou.

LOQ ....8 s.... 2,872 mg/l

LOD....1 s..... x mg/l

$$x = \frac{1 \cdot 2{,}872}{8} = 0{,}359\ mg\ /\ l$$

Tab. 26: Medze kvantifikácie a detekcie pre všetkých 6 organických kyselín.

	Názov kyseliny					
LOQ [mg/l]	**mliečna**	**šťaveľová**	**citrónová**	**jantarová**	**octová**	**benzoová**
	18,8650	2,4370	2,8720	3,7060	3,0820	25,1500
LOD [mg/l]	0,9433	0,1160	0,3590	0,7412	0,2568	0,8113

5.1.2.3 Linearita a rozsah metódy

Linearita je schopnosť metódy poskytnúť v danom rozsahu prijateľnú lineárnu koreláciu medzi odozvou detektoru a koncentráciou analytu vo vzorke. Jedná sa o priamu závislosť jednej veličiny (signálu) na druhej nezávislej premennej (koncentrácii). Táto závislosť je matematicky vyjadrená ako

$$y = kx + q, \tag{12}$$

kde parameter q je posunutie na ose y a parameter k je smernica kalibračnej krivky

Tesnosť vzájomnej závislosti dvoch náhodných premenných charakterizuje korelačný koeficient (R). Zaujíma hodnoty ± 1. Čím bližšie je 1, tým je závislosť oboch premenných tesnejšia. Praktický postup určenia linearity metódy zahrňuje prípravu najmenej 5 kalibračných roztokov na rôznych koncentračných úrovniach pokrývajúcich celý rozsah metódy [30]. Výsledné hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 27.

Tab. 27: Hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín.

Názov kyseliny	Linearita [mg/l]
mliečna	18,47 – 184,7
šťaveľová	2,3 –23
jantárová	3,62 – 36,2
citrónová	3,6 – 36
octová	4,4 – 44
benzoová	25,15 – 302,1

Kalibračné krivky organických kyselín

Kalibračné krivky 6 organických kyselín (mliečna, šťaveľová, citrónová, octová, jantárová, benzoová) boli zostavené nameraním 5 štandardov, pripravených postupom uvedeným v kapitole 4.1.4.4 ako závislosť zóny na koncentrácii. Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 28. Kalibračné krivky všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v prílohách viď. Obr. 14 - Obr. 19. Pre vizuálnu ukážku všetkých 6 organických kyselín, sú v prílohách uvedené izotachoforegramy viď. Obr. 20 - Obr. 25 ich štandardu č. 5, ktorý tvorí posledný bod kalibračnej krivky.

Tab. 28: Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre kalibračné krivky organických kyselín

Názov kyseliny	Rovnica regrese	Hodnota spoľahlivosti
mliečna	y = 0,6443x + 7,7203	0,9989
šťaveľová	y = 2,0005x + 2,499	0,9688
citrónová	y = 0,9446x + 0,4425	0,9909
octová	y = 1,4239x + 6,1517	0,9977
jantárová	y = 1,2821x + 0,0426	0,9874
benzoová	y = 0,9465x + 0,5107	0,9964

5.1.2.4 Presnosť metódy

Presnosť metódy je definovaná ako hodnota udávajúca mieru tesnosti zhody medzi vzájomne nezávislými výsledkami skúšok za presne špecifikovaných podmienok. Presnosť metódy môže byť vyjadrená ako **opakovateľnosť.** Opakovateľnosť sa označuje skratkou RSD a závisí na analytickej metóde a na koncentrácii analytu. Miera presnosti je počítaná ako relatívna smerodajná odchýlka výsledkov skúšok [30]. RSD pre všetky analyzované organické kyseliny bolo stanovené u jednej zo vzoriek 11 pív, podľa nasledujúceho vzťahu a výsledné hodnoty sú uvedené v Tab. 29.

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100\ \% \quad , \tag{13}$$

kde s - je relatívna smerodajná odchýlka a x - je priemer.

Tab. 29: Výsledné hodnoty pre opakovateľnosť vzorky piva.

č. merania	Koncentrácia [mg/l]					
	mliečna	**šťaveľová**	**jantárová**	**citrónová**	**octová**	**benzoová**
1	150,9110	1,0370	2,7780	15,5130	19,9430	34,8290
2	151,7640	1,3030	2,3540	15,0410	24,7780	25,8280
3	149,9040	1,3270	2,3930	15,3040	22,5700	27,4070
Priemer	150,8597	1,2223	2,5083	15,2860	22,4303	29,3547
Smerod. odchýlka	0,9311	0,1610	0,2344	0,2365	2,4205	4,8062
%RSD	0,62	13,17	9,34	1,55	10,79	16,37

5.1.2.5 Výťažnosť

Výťažnosť (recovery) je pomer množstva analytu získaného analytickou metódou k prijatej referenčnej hodnote. Na výťažnosť sa používa vzorka obohatená štandardom. Výťažnosť sa počíta podľa nižšie uvedeného vzťahu a hodnota výťažnosti vychádza v percentách [30].

$$Výťažnosť = \left(\frac{c_3 - c_2}{c_1} \right) \cdot 100\,[\%], \tag{14}$$

kde je c_1 - koncentrácia štandardu, c_2 - koncentrácia vzorky, c_3 - koncentrácia vzorky obohatenej štandardom (mix).

Výťažnosť bola stanovená u jednej zo vzoriek zo sady 11 pív. Výsledné hodnoty výťažnosti pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 30.

Tab. 30: Výsledné hodnoty koncentrácii a výťažnosti organických kyselín.

Názov kyseliny	Koncentrácia [mg/l]			Výťažnosť
	Štandard 5	Vzorka	Mix	
mliečna	204,2500	187,9660	355,5630	82,06
šťaveľová	17,2850	0,0680	14,9280	85,97
jantárová	39,5910	1,4680	41,7470	101,74
citrónová	36,1270	15,7760	46,9320	86,24
octová	46,3950	13,6000	43,8020	65,10
benzoová	305,8560	23,1960	349,0710	106,55

5.2 Stanovenie organických kyselín pomocou HPLC

K analýze organických kyselín pomocou HPLC/UV bolo podrobených všetkých 11 vzoriek pív. Výsledky u jednotlivých vzoriek pív sú uvedené v

Tab. 31 - Tab. 41 ako priemerné hodnoty dvoch paralelných stanovení plôch píkov a koncentrácií. Koncentrácie organických kyselín v analyzovaných vzorkách pív, boli vypočítané z kalibračných kriviek robených do matrice. V prílohách je na ukážku uvedený chromatogram jedného zo vzoriek analyzovaných pív viď. Obr. 45.

Tab. 31: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 1.

číslo vzorky	1	
Názov kyseliny	Plocha píku	Koncentrácia [mg/l]
mliečna	0,2315	85,3848
šťaveľová	0,3416	5,0585
jantárová	0,2460	42,1590
citrónová	0,6611	142,8997
octová	0,2558	52,2378

Tab. 32: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 2.

číslo vzorky	2	
Názov kyseliny	Plocha píku	Koncentrácia [mg/l]
mliečna	0,0458	7,6114
šťaveľová	0,2598	3,9475
jantárová	0	N. D.
citrónová	0	N. D.
octová	0,1340	23,8441

Tab. 33: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 3.

číslo vzorky	**3**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,2713	102,0535
šťaveľová	0,3188	4,7488
jantárová	0	N. D.
citrónová	0	N. D.
octová	0,3385	71,5166

Tab. 34: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 4.

číslo vzorky	**4**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,1303	43,0010
šťaveľová	0,4000	5,8516
jantárová	0,0545	N. D.
citrónová	0,3841	82,5250
octová	0,1455	26,5249

Tab. 35: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 5.

číslo vzorky	**5**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,2548	95,1431
šťaveľová	0,3422	5,0666
jantárová	0	N. D.
citrónová	0,2914	62,3202
octová	0,1265	22,0957

Tab. 36: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 6.

číslo vzorky	**6**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,4422	173,6284
šťaveľová	0,2521	3,8430
jantárová	0,2131	30,2441
citrónová	0	N. D.
octová	0,4710	102,4047

Tab. 37: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 7.

číslo vzorky	**7**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,4806	189,7108
šťaveľová	0,3351	4,9702
jantárová	0,1088	N. D.
citrónová	0,4995	107,6775
octová	0,1910	37,1318

Tab. 38: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 8.

číslo vzorky	**8**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,2614	97,9072
šťaveľová	0,3305	4,9077
jantárová	0	N. D.
citrónová	0,4810	103,6453
octová	0,1264	22,0724

Tab. 39: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 9.

číslo vzorky	**9**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,3420	131,6635
šťaveľová	0,3523	5,2038
jantárová	0,1034	N. D.
citrónová	0,3569	76,5965
octová	0,1060	17,3168

Tab. 40: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 10.

číslo vzorky	**10**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,3636	140,7098
šťaveľová	0,2755	4,1608
jantárová	0,1479	6,6314
citrónová	0,4674	100,6810
octová	0,1444	26,2685

Tab. 41: Výsledky analýzy organických kyselín pre vzorku č. 11.

číslo vzorky	**11**	
Názov kyseliny	**Plocha píku**	**Koncentrácia [mg/l]**
mliečna	0,0775	20,8877
šťaveľová	0,3015	4,5139
jantárová	0,1440	5,2190
citrónová	0,4777	102,9260
octová	0,1252	21,7927

5.2.1 Štatistické spracovanie výsledkov

Validácia je proces, ktorým si potvrdíme, že náš zvolený postup je vhodný a správny pre získanie relevantných výsledkov.

5.2.1.1 Medza stanovitelnosti (kvantifikácie) - LOQ

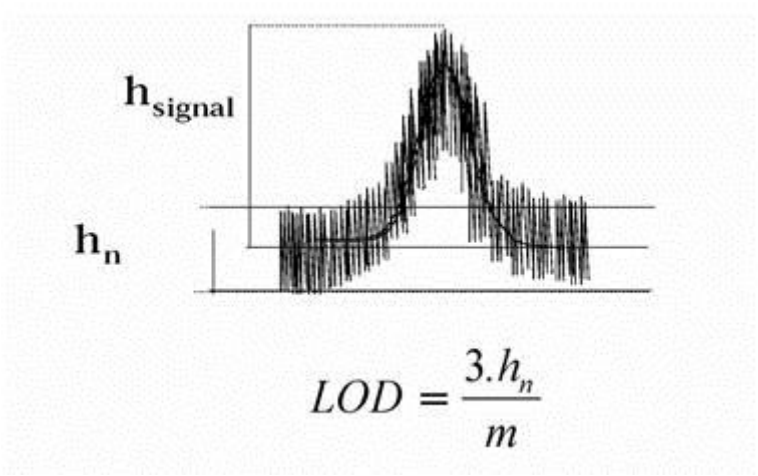
Odpovedá koncentrácii, pri ktorej presnosť a správnosť stanovenia dovoľuje kvantitatívne vyhodnotenie. Limit kvantifikácie sa počíta podľa nižšie uvedeného vzťahu [30].

$$LOQ = 10 \cdot \frac{šum}{k} \tag{15}$$

5.2.1.2 Medza detekcie (LOD)

Odpovedá koncentrácii, pre ktorú je analytický signál štatisticky významne odlišný od šumu. Limit detekcie sa počíta podľa nižšie uvedeného vzťahu [30]. Názorná ukážka princípu výpočtu medze detekcie je uvedená na Obr. 13.

$$LOD = 3 \cdot \frac{šum}{k} \tag{16}$$



Obr. 13:Zobrazenie princípu výpočtu limitu detekcie [33].

Limit detekcie i limit kvantifikácie bol vypočítaný podľa vzťahov č. 14 a 15. Hodnoty limitov detekcie a kvantifikácie pre všetkých 5 stanovovaných kyselín vo vzorku zmiešaného štandardu sú uvedené v Tab. 42.

Tab. 42: Hodnoty limitov detekcie a kvantifikácie organických kyselín.

	Názov kyseliny				
LOQ [mg/l]	**mliečna**	**šťaveľová**	**citrónová**	**jantárová**	**octová**
	52,9228	3,2078	29,7000	55,5778	34,3600
LOD [mg/l]	15,8768	0,9623	8,9100	16,6733	10,3080

5.2.1.3 Linearita a rozsah metódy

Linearita je schopnosť metódy poskytnúť v danom rozsahu prijateľnú lineárnu koreláciu medzi odozvou detektoru a koncentráciou analytu vo vzorke. Jedná sa o priamu závislosť jednej veličiny (signálu) na druhej nezávislej premennej (koncentrácii). Táto závislosť je matematicky vyjadrená ako

$$y = kx + q, \tag{17}$$

kde parameter q je posunutie na ose y a parameter k je smernica kalibračnej krivky.

Tesnosť vzájomnej závislosti dvoch náhodných premenných charakterizuje korelačný koeficient (R). Zaujíma hodnoty ± 1. Čím bližšie je 1 tým je závislosť oboch premenných tesnejšia. Praktický postup určení linearity metódy zahrňuje prípravu najmenej 5 kalibračných roztokov na rôznych koncentračných úrovniach pokrývajúcich celý rozsah metódy [30]. Výsledné hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín sú uvedené v Tab. 43.

Tab. 43: Hodnoty linearity pre všetkých 6 organických kyselín.

Názov kyseliny	Linearita [mg/l]
mliečna	30,17 – 1508,30
šťaveľová	2,05 – 102,65
jantárová	5,00 – 250,10
citrónová	5,05 – 252,45
octová	10,31 – 515,40

Kalibračné krivky organických kyselín do matrice

Pri zostavení kalibračných kriviek organických kyselín bol braný v úvahu vplyv matričného efektu. Kalibračné krivky boli tvorené 5 bodmi a ich odpovedajúce plochy píkov u jednotlivých organických kyselín boli získané priemerom dvoch paralelných hodnôt získaných z chromatogramu a následne odčítané od priemernej hodnoty plochy píku pre 6 bod kalibrácie, ktorý obsahoval iba čistú matricu. Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre všetkých 5 organických kyselín sú uvedené v Tab. 44. Kalibračné krivky pre jednotlivé organické kyseliny sú uvedené v prílohách viď. Obr. 37 - Obr. 41. V prílohách je uvedený pre ukážku chromatogram zmiešaného štandardu bez matrice (Obr. 42), chromatogram zmiešaného štandardu s matricou (Obr. 43) a na Obr. 44 sú preložené oba chromatogramy zmiešaného štandardu bez matrice a s matricou.

Tab. 44: Rovnice regrese a hodnoty spoľahlivosti pre kalibračné krivky organických kyselín.

Názov kyseliny	Rovnica regrese	Hodnota spoľahlivosti
mliečna	y = 0,0024x + 0,0276	0,9984
šťaveľová	y = 0,0736x – 0,0309	0,9998
citrónová	y = 0,0046x + 0,0055	0,9972
octová	y = 0,0043x + 0,0317	0,9993
jantárová	y = 0,0028x + 0,1296	0,9664

5.2.1.4 Presnosť metódy (opakovateľnosť nástreku)

Presnosť metódy je definovaná ako hodnota udávajúca mieru tesnosti zhody medzi vzájomne nezávislými výsledkami skúšok za presne špecifikovaných podmienok. Presnosť metódy môže byť vyjadrená ako **opakovateľnosť.** Opakovateľnosť sa označuje skratkou RSD a závisí na analytickej metóde a na koncentrácii analytu [30]. Pre opakovateľnosť nástreku bola 5 krát nameraná vzorka piva pripravovaná pre stanovenie matricového efektu. Postup prípravy tohoto vzorku je uvedený v kapitole 4.2.5.4

Miera presnosti je počítaná ako relatívna smerodajná odchýlka výsledkov skúšok. RSD bolo počítané podľa nasledujúceho vzťahu a výsledné hodnoty sú uvedené v Tab. 45.

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100\ \% \quad , \tag{18}$$

kde s je relatívna smerodajná odchýlka a x je priemer.

Tab. 45: Hodnoty plôch píkov a opakovateľnosti pre 5 organických kyselín.

Č. merania	**Plocha píku**				
	šťaveľová	**mliečna**	**octová**	**citrónová**	**jantárová**
1	0,6335	0,3107	0,1677	0,0766	0,0410
2	0,6341	0,2898	0,1582	0,0917	0,0402
3	0,6020	0,3039	0,1491	0,0907	0,0461
4	0,6171	0,3058	0,1419	0,0940	0,0430
5	0,5624	0,3068	0,1503	0,0951	0,0413
Priemer	0,6098	0,3034	0,1534	0,0896	0,0423
Smero. odchýkla	0,0296	0,0080	0,0098	0,0075	0,0023
% RSD	4,86	2,64	6,42	8,35	5,55

5.2.1.5 Výťažnosť

Výťažnosť (recovery) je pomer množstva analytu získaného analytickou metódou k prijatej referenčnej hodnote. Na výťažnosť sa používa vzorka obohatená štandardom. Výťažnosť sa počíta podľa nižšie vzťahu a hodnota výťažnosti vychádza v percentách.

$$Výťažnosť = \left(\frac{c_3 - c_2}{c_1} \right) \cdot 100\,[\%], \tag{19}$$

kde je c_1 - koncentrácia štandardu, c_2 - koncentrácia vzorky, c_3 - koncentrácia vzorky obohatenej štandardom (mix) [30].

Výťažnosti jednotlivých kyselín boli počítané pomocou vzorca 19 a sú uvedené v Tab. 46 ako priemerné hodnoty dvoch paralelných stanovení.

Tab. 46: Hodnoty výťažnosti pre mix 2 krát viac a pre mix 5 krát viac.

Názov kyseliny	**Mix 2 krát viac**	**Mix 5 krát viac**
	Výťažnosť [%]	**Výťažnosť [%]**
šťaveľová	90,46	72,07
mliečna	94,51	71,46
octová	14,57	27,61
citrónová	129,08	167,43
jantárová	49,26	42,54

6 DISKUSIA

6.1 Optimalizácia extrakčných podmienok

Bol vyskúšaný nástrek piva bez úpravy a z chromatogramu uvedenom na Obr. 46, je vidieť, že stanovenie organických kyselín ruší veľa interferentov prítomných v matrici. Vzhľadom k tomu bola pre úpravu vzorku zvolená extrakcia na pevnej fázy SPE. Boli použité kolónky Discovery DSC – SAX 3ml 500 mg (Supelco, USA). Vychádzali sme z podmienok viď. Citácia [39]. Na kondicionáciu kolónky bol použitý metanol o objeme 2 ml, na premytie kolónky bola zvolená deionizovaná voda, ale bolo zistené, že separácie neprebiehala a preto bola použitá k aktivácii kolónky 1 M HCl. Vzorka piva bola riedená 1:1 a aplikovaná v objeme 2 ml bez úpravy pH a s úpravou pH na hodnotu 9 pomocou NaOH. Bolo zistené, že po úprave pH došlo k lepšiemu zadržaniu aniónov kyselín v dôsledku úplnej disociácie. Kolónka bola premytá deionizovanou vodou o objeme 3 ml. Bolo skúšané vysušenie kolónky vzduchom viď. citácia [39], ale neosvedčilo sa nám to, pretože dochádzalo k upchaniu kolónky. Elúcia bola prevedená 0,05 M H_2SO_4, najskôr 3 krát 2 ml a potom 3 krát 1 ml z dôvodu lepšieho zakoncentrovania. Bola zachytávaná voda a všetky 3 elučné frakcie, ktoré boli premerané na HPLC. Vo vode a v prvej a tretej frakcii neboli kyseliny nájdené. Konečné podmienky extrakcie sú uvedené v kapitole 4.2.3.1.

6.2 Optimalizácia chromatografických podmienok

Pre stanovenie organických kyselín metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie bola optimalizovaná stacionárna i mobilná fáza. Vychádzali sme z podmienok metódy, kde stacionárnu fázu tvorila kolóna Acclaim Organic acid (250 x 4 mm, 5 µm) Dionex, a mobilná fáza bol pufr 0,1 M dihydrogenfosforečnan draselný upravený kyselinou methansulfonovou na pH = 2,65. Tieto podmienky, vhodné na stanovenia organických kyselín udáva výrobca. Za týchto podmienok dochádzalo k optimálnej separácii organických kyselín v roztoku zmiešaného štandardu, ale pri analýze reálneho vzorku dochádzalo k interferencii kyseliny mliečnej s komponentami matrice, preto bol skúšaný ďalší chromatografický systém. Vychádzali sme s podmienok uvedených v literatúre [40]. Stacionárna fáza bola Synergi 4µm Hydro-RP 80A a mobilnou fázou bola zmes 0,05 M dihydrogénfosforečnanu sodného monohydrátu upraveného na pH = 2,1 kyselinou fosforečnou a acetonitril. Boli skúšané podmienky 3 %, 2 %, 1 % acetonitrilu. Ako najvhodnejší sa ukázala zmes 99 % 0,05 M dihydrogénfosforečnanu sodného monohydrátu upraveného na pH = 2,1 kyselinou fosforečnou a 1 % acetonitrilu. V týchto pdmienkach došlo k rozdelení 5 sledovaných kyselín takmer na základnej línii. Konečné chromatografické podmienky sú uvedené v Tab. 10.

6.3 Stanovenie organických kyselín metódou CITP

Metódou kapilárnej izotachoforézy bolo stanovené 6 organických kyselín (šťaveľová, octová, jantárová, citrónová, mliečna a benzoová) v 11 vzorkách pív. Obsah kyseliny šťaveľovej sa pohyboval v rozsahu 0,3425 - 7,1225 mg/l. Kyselina šťaveľová nebola detegovaná v 4 vzorkách piva č. 1, 2, 6 a 9. Kyselina mliečna bola detegovaná v rozsahu 379,5563 – 754,2983 mg/l. Kyselina octová bola stanovená v rozsahu 47,4200 – 109,8750 mg/l.

Kyselina citrónová bola stanovená v rozsahu 48,9800 – 131,2000 mg/l. Kyselina jantárová bola stanovená v rozsahu 6,4750 – 45,2700 mg/l. Kyselina benzoová bola stanovená v rozsahu 64,9225 – 190,1117 mg/l. Najvyšší obsah kyseliny benzoovej 190,1117 mg/l, bol stanovený vo vzorke č. 1. Jednalo sa o jediné alkoholické pivo zo sady 11 analyzovaných pív.

6.4 Stanovenie organických kyselín metódou HPLC/UV

Metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie bolo stanovené 5 organických kyselín (šťaveľová, octová, jantárová, citrónová a mliečna) v 11 vzorkách pív.

Kyselina šťaveľová bola stanovená v rozsahu 3,8430 – 5,8516 mg/l. Kyselina octová bola stanovená v rozsahu 17,3168 – 102,4047 mg/l. Výsledné hodnoty koncentrácii kyseliny octovej a šťaveľovej v celej sade 11 pív boli u oboch metód zrovnateľné, ale nezhodujú sa, pretože merania metódou CITP a HPLC neprebiehalo súčasne, ale z odstupom času a preto sa vplyvom zmrazovania a rozmrazovania mohli vzorky pív meniť. Vplyv majú i metódy stanovenia. Kyselina šťaveľová stanovená metódou HPLC a CITP vykazovala najvyššiu hodnotu, u jediného tmavého piva, vzorky č. 4.

Kyselina jantárová bola stanovená v rozsahu 5,2190 – 42,1590 mg/l a nebola detegovaná v 7 vzorkách pív č. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9. Príčinou nedetegovania je, že kyselina jantárová mala malú odozvu vzhľadom ku koncentrácii. Ďalšími faktormi, ktoré rušia stanovenie sú matricový efekt a tiež pomocou metódy CITP bolo vo vzorkách stanovené nepatrné množstvo kyseliny jantárovej. V ostatných vzorkách zo sady 11 pív bola kyselina jantárová stanovená v koncentráciách zrovnateľných s výsledkami určenými kapilárnou izotachoforézou.

Kyselina citrónová bola stanovená v rozsahu 62,3202 – 142,8997 mg/l a nebola detegovaná v 3 vzorkách piva č. 2, 3, 6. Stanovenie kyseliny citrónovej u ostatných vzoriek pív je zaťažené chybou, pretože dochádzalo ku koelúcii kyseliny citrónovej zo zložkami matrice. Tieto zložky sa nepodarilo odstrániť prečistením extrakciou SPE, ani oddeliť pomocou chromatografických podmienok. Napriek tomu sa kyselinu citrónovú podarilo stanoviť u 8 vzoriek z 11 vzoriek pív a výsledky boli zrovnateľné z výsledkami určenými kapilárnou izotachoforézou.

Kyselina mliečna bola detegovaná v rozsahu 7,6114 – 189,7108 mg/l. Množstvo kyseliny mliečnej stanovenej HPLC vo vzorkách 11 pív bolo približne 5 krát menšie, než po stanovení CITP. Domnievame sa , že rozdiel v koncentráciách môže byť spôsobený rozdielnosťou metód stanovenia a zmenami spôsobenými pri rozmrazovaní a zamrazovaní vzoriek počas skladovania. Podľa výťažnosti kyseliny mliečnej stanovenej metódou HPLC, súdime, že nedošlo k významným stratám pri prečistení extrakciou na pevnú fázu.

Výsledné koncentrácie organických kyselín stanovené oboma metódami HPLC a CITP vo vzorkách 11 pív boli zrovnateľné z literatúrou [19, 35, 36, 37, 38, 39], hoci nájdené obsahy organických kyselín sa líšia v závislosti na zemi pôvodu nápoja, použitej technológií a metódy stanovenia. V našom prípade obsahy sledovaných organických kyselín vo vzorkách nevykazovali významné štatistické rozdiely.

Výrobcovia pív neuvádzajú v zložení výrobku obsah organických kyselín. U štyroch vzoriek bola kyseliny mliečna uvedená na obale výrobku, ale stanovením metódou CITP ani HPLC nebol zistený vyšší obsah kyseliny mliečnej u týchto 4 vzoriek v porovnaní z ostatnými vzorkami. Ostatné kyseliny neboli uvedené na obale, ani na webových stránkach výrobcov. Maximálne povolené koncentrácie nie sú uvedené ani v normách ČSN.

6.5 Diskusia štatistického vyhodnotenia výsledkov

6.5.1 Medza detekcie a medza kvantifikácie CITP

Boli vyhodnotené medze kvantifikácie a medze detekcie u všetkých analyzovaných organických kyselín u oboch metód stanovenia (HPLC a CITP). Najnižšiu medzu kvantifikácie i detekcie mala u oboch metód kyselina šťaveľová. U metódy CITP bola najvyššia medza kvantifikácie zistená u kyseliny benzooovej a najvyššia medza detekcie u kyseliny mliečnej. U metódy HPLC mala najvyššiu medzu kvantifikácie i detekcie kyselina jantárová (viď. Tab. 47).

Hodnoty limitu detekcie získané metódou CITP boli u všetkých organických kyselín nižšie, než u metódy HPLC, preto môžeme usudzovať, že metóda kapilárnej izotachoforézy je pre stanovenie organických kyselín citlivejšia.

Tab. 47: Porovnanie limitov kvantifikácie a detekcie pre obe metódy.

Názov metódy		**Názov kyseliny**					
		mliečná	**šťaveľová**	**citrónová**	**jantarová**	**octová**	**benzoová**
LOQ [mg/l]	**CITP**	18,8650	2,4370	2,8720	3,7060	3,0820	25,1500
	HPLC	52,9228	3,2078	29,7000	55,5778	34,3600	-
LOD [mg/l]	**CITP**	0,9433	0,1160	0,3590	0,7412	0,2568	0,8113
	HPLC	15,8768	0,9623	8,9100	16,6733	10,3080	-

6.5.2 Linearita

Z hodnôt korelačných koeficientov (viď. Tab. 48), získaných z kalibračných kriviek pre všetky analyzované organické kyseliny u oboch metód, môžeme usudzovať, že obe metódy mali vysoké hodnoty R^2 u všetkých organických kyselín a teda obe metódy sú vhodné pre stanovenie organických kyselín.

Tab. 48: Hodnoty korelačných koeficientov u oboch metód stanovenia organických kyselín.

Názov metódy	**CITP**	**HPLC**
Názov kyseliny	**R^2**	**R^2**
mliečna	0,9989	0,9984
šťaveľová	0,9688	0,9989
citrónová	0,9909	0,9972
octová	0,9977	0,9993
jantárová	0,9874	0,9664
benzoová	0,9964	-

6.5.3 Opakovateľnosť CITP

Opakovateľnosť metódy bola overená prostredníctvom jednej zo vzoriek pív pre všetkých 6 organických kyselín a výsledné hodnoty RSD uvádza Tab. 29. Všetkých 6 organických kyselín malo hodnoty RSD do 20 %. Najnižšiu hodnotu RSD mala kyselina mliečna a to 0,62 % a najvyššiu hodnotu mala kyselina benzoová a to 16,37 %.

6.5.4 Opakovateľnosť HPLC

Presnosť metódy bola overená opakovateľnosťou nástreku, zmeraním 5x vzorky piva, pripravovaného pre stanovenie matricového efektu. Pre všetkých 5 analyzovaných organických kyselín bola hodnota RSD do 20 %. Najvyššia hodnota RSD vyšla pre kyselinu citrónovú a to 8,35 % a najnižšia pre kyselinu mliečnu 2,64 % (viď. Tab. 45).

6.5.5 Výťažnosť u metódy CITP

Výťažnosť metódy bola stanovená u jednej zo vzoriek pív a bola vyjadrená u všetkých 6 organických kyselín (viď. Tab. 30). Najvyššia výťažnosť bola zistená u kyseliny benzoovej a to 106,55 %. Najnižšiu výťažnosť mala kyselina octová a to 65 %. Nízka hodnota výťažnosti u kyseliny octovej mohla byť spôsobená jej prchavosťou.

6.5.6 Výťažnosť u metódy HPLC

Výťažnosť u metódy HPLC bola stanovená ako výťažnosť použitých kolóniek na extrakciu na pevnej fázy. Výťažnosť bola stanovená zvlášť pomocou vzorky obohatenej štandardom o 2 násobnom obsahu organických kyselín oproti pivu (mix 2 x) a zvlášť pomocou vzorky o 5 násobnom obsahu organických kyselín oproti pivu (mix 5x) viď. Tab. 46. Výťažnosť organických kyselín pre stanovenie s mixom 2 krát viac vychádza u kyseliny mliečnej, šťaveľovej, jantárovej, i citrónovej vyššie i lepšie, než u stanovení s mixom 5 krát viac.

6.5.7 Porovnanie výťažností organických kyselín u oboch metód stanovenia

Výťažnosti organických kyselín u oboch metód stanovenia sú uvedené v Tab. 49. Výťažnosti u kyseliny šťaveľovej a mliečnej boli v priemere zrovnateľné u oboch metód. Nižšie výťažnosti kyseliny octovej u oboch metód mohli byť spôsobené tým, že kyselina je prchavá. Vyššia výťažnosť stanovená HPLC u kyseliny citrónovej, v priemere 148 % bola spôsobená matričnými efektami, ktoré sa nám nepodarilo úplne odstrániť prečistením na SPE, ani modifikáciou chromatografických podmienok. Nižšia výťažnosť kyseliny jantárovej stanovená HPLC mohla byť spôsobená skutočnosťou, že táto kyselina má za daných podmienok nižšiu odozvu na UV detektore.

Tab. 49: Výťažnosti organických kyselín u oboch metód stanovenia.

Názov metódy	**HPLC**		**CITP**
	Mix 2 krát viac	**Mix 5 krát viac**	**Výťažnosť [%]**
Názov kyseliny	**Výťažnosť [%]**	**Výťažnosť [%]**	
šťaveľová	90,46	72,07	85,97
mliečna	94,51	71,46	82,06
octová	14,57	27,61	65,1
citrónová	129,08	167,43	86,24
jantárová	49,26	42,54	101,74

7 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo stanoviť koncentrácie 6 organických kyselín (mliečnej, šťaveľovej, jantárovej, octovej, citrónovej a benzoovej) v 11 analyzovaných pivách zakúpených v obchodnej sieti.

V prvej časti literárnej rešerše je uvedená história, charakteristika a technológia výroby piva. Ďalej je uvedený popis organických kyselín stanovovaných v pive. V druhej časti sú charakterizované metódy stanovenia organických kyselín (HPLC/UV a CITP). Oboma metódami bolo stanovených 5 organických kyselín (mliečna, šťaveľová, citrónová, jantárová, octová) a 6 kyselina benzoová bola stanovená iba metódou CITP.

Pred samotnou analýzou HPLC bolo nutné vzorky upraviť extrakciou na tuhú fázu. Bol použitý mechanizmus SPE na silnom aniontovom iontomeniči SAX.

V rámci optimalizácie oboch metód stanovenia bola vypracovaná validácia. Pre obe metódy boli stanovené limity kvantifikácie, detekcie, linearita, opakovateľnosť a výťažnosť. V diskusii boli parametre validácie pre obe metódy navzájom porovnané. Pre stanovenie organických kyselín v týchto typoch vzorku bola považovaná za vhodnejšiu metódu kapilárna izotachoforéza.

Celkový obsah organických kyselín stanovených CITP u jednotlivých analyzovaných vzoriek pív sa pohyboval v rozsahu 0,7270 – 1,0732 g /l.

Výsledné koncentrácie organických kyselín stanovené oboma metódami HPLC a CITP vo vzorkách 11 pív boli zrovnateľné navzájom i zrovnateľné z literatúrou.

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.

2. COOTE, N. a B. H. KIRSOP. *The content of some organic acids in beer and other fermented media*. Journal of the Institute of Brewing. 1974, 474-483. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x. ISBN 10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x. Dostupné také z: <doi.wiley.com>.

3. DYR, Josef. *Organické kyseliny a rozpouštědla Díl II. – Organické kyseliny*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1957, 146.

4. CORTACERO-RAMÍREZ, Sonia, Miguel HERNÁINZ-BERMÚDEZ DE CASTRO, Antonio SEGURA-CARRETERO, Carmen CRUCES-BLANCO a Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. *Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, 22 (7), 440-455 [cit. 2017-02-09]. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00704-0. ISSN 01659936. Dostupné z: <linkinghub.elsevier.com>.

5. SÁDECKÁ, J a J POLONSKÝ. *Electrophoretic methods in the analysis of beverages*. Journal of Chromatography *A* [online]. 2000, 880 (1-2), 243-279 [cit. 2017-02-09]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00426-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <linkinghub.elsevier.com>.

6. BOČEK, Petr. *Analytická kapilární izotachoforéza*. 1. vyd. Praha: Academia, 1987. POKROKY CHEMIE, 18. ISBN neuvedeno.

7. MATĚJKA, Pavel, Michaela KOUDELKOVÁ, Zdeněk DEYL, et al. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-466-1.

8. PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu.* Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 8090243290.

9. ČAKRT, Miroslav. *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu.* 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2001. Analytical standards and equipment. ISBN 8086380076.

10. ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy"* : modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 9788026070856.

11. ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Instrumentální a strukturní analýza (prednáška)*, FCH VUT, Brno, 2015.

12. GRATZFELD-HÜSGEN Angelika and SCHUSTER Rainer. *HPLC for Food Analysis*. Germany.: Agilent Technologies Company, 2001. Publication Number: 5988-3294EN.

13. CHLÁDEK, Ladislav. *Pivovarnictví*. Praha: Grada, 2007. Řemesla, tradice, technika. ISBN 978-80-247-1616-9.

14. KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.

15. ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 8070802391.

16. DRDÁK, Milan. *Základy potravinárskych technológií spracovania rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum, 1996, 511 s. ISBN 80-967-0641-1.

17. BASAŘOVÁ, Gabriela a kolektiv. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. 1. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 978-80-87109-47-2.

18. BASAŘOVÁ, Gabriela, Jan ŠAVEL, Peter BASAŘ a Tomáš LEJSEK. *Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva*. Praha: VŠCHT Praha, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.

19. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.

20. ŠTEFECOVÁ, Klára a Jaroslav ČEPIČKA. *Průběh změn hlavních organických kyselin v průběhu vinifikace* [online]. VŠCHT Praha: Kvasný průmysl, 2001, 47/2001(9) [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: <kvasnyprumysl.cz>.

21. PETRONELA, Cornelia a Elena DIACU. *Hight - performance liquid chromatography method for the determination of benzoic acid in beverages* [online]. Rumunsko: Universitatea Politehnica Bucuresti, 2009, 71(4) [cit. 2017-04-24]. ISSN 14542331. Dostupné z: <scimagojr.com>.

22. PREMANAND, D.C., K.L. SENTHILKUMAR, B. SENTHILKUMAR, M. SARAVANAKUMAR a R. THIRUMURTHY. *Validated RP-HPLC method for the determination of Benzoic acid in bulk and pharmaceutical formulation* [online]. Pelagia Research Library, 2014 [cit. 2017-03-15]. ISSN 0976-8505. Dostupné z: <pelagiaresearchlibrary.com>.

23. VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme?: aneb Průvodce Éčky v potravinách*. 1. Praha: EcoHouse, 2001, 268 s. ISBN 8023875043.

24. INGR, Ivo. *Základy konzervace potravin*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, 1999, 119 s. ISBN 8071573965.

25. PICÓ, Yolanda. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications* [online]. 1. USA: Elsevier, 2012 [cit. 2017-03-22]. ISBN 978-0-12-384863-5. Dostupné z: <app.knovel.com>.

26. KANIANSKY, Dušan. *Kapilárna izotachoforéza: Základné princípy.* Spišská Nová Ves: Ústav rádiológie a využitia jadrovej techniky - Výrobno - vývojový závod prístrojov jadrovej techniky, 1985.

27. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

28. LINDEBERG, Johan. *Capillary electrophoresis in food analysis*. Elsevier [online]. 1996, 55(1), 73 - 94 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/0308-8146(96)81729-8. ISBN 10.1016/0308-8146(96)81729-8. Dostupné z: <linkinghub.elsevier.com>.

29. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3

30. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* Praha: Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

31. *Solid Phase Extraction Products: Improve Sensitivity and increase Throughput*. Sigma – Aldrich [online]. 2015 [cit. 2017-04-07]. Dostupné z: <sigmaaldrich.com>.

32. SELF, Ron. *Extraction of Organic Analytes from Foods: A Manual of Methods*. UK: The Royal Society of Chemistry, 2005. ISBN 0-85404-592-9.

33. *HPLC: mez detekce* [online]. Praha, 2013 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: <hplc.cz>.

34. ČERNOCH, I. *Předpověď gushingu v jačmeni*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2003. 93 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Pavla Havlová.

35. PAI, Tapasya V., Siddhi Y. SAWANT, Arindam A. GHATAK, Palak A. CHATURVEDI, Arpita M. GUPTE a Neetin S. DESAI. *Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potentia*l. Springer. 2015, 52(3), 1414 - 1423. DOI: 10.1007/s13197-013-1152-2.. Dostupné také z: <springer.com>.

36. SANTALAD, Apichai, Pattana TEERAPORNCHAISIT, Rodjana BURAKHAM a Supalax SRIJARANAI. *Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages*. Elsevier. 2007, 40(10), 1741–1746. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.007.

37. MONTANARI, Luigi, Giuseppe PERRETTI, Fausta NATELLA, Alessia GUIDI a Paolo FANTOZZ. *Organic and Phenolic Acids in Beer*. 1999, 32(8), 535 - 539.

38. T., Pérez-Ruiz a Martínez-Lozano C. *High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection*. PubMed. 2004, 1026(1-2), 57-64.

39. KUKLEVA, E. *Stanovení organických kyselin v pivu metodou HPLC*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2013. 42 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

40. SlideShare: New HPLC Column; InertSustain AQ C18 technical info [online]. Science, 2015 [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <slideshare.net>.

41. Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin Příl.6: Seznam konzervantů povolených při výrobě potravin nebo skupin potravin a podmínky jejich použití. In: . ČR: Sbírka zákonů ČR, 2008, 3/2008, 4/2008 Sb. Dostupné také z: <zakonyprolidi.cz>.

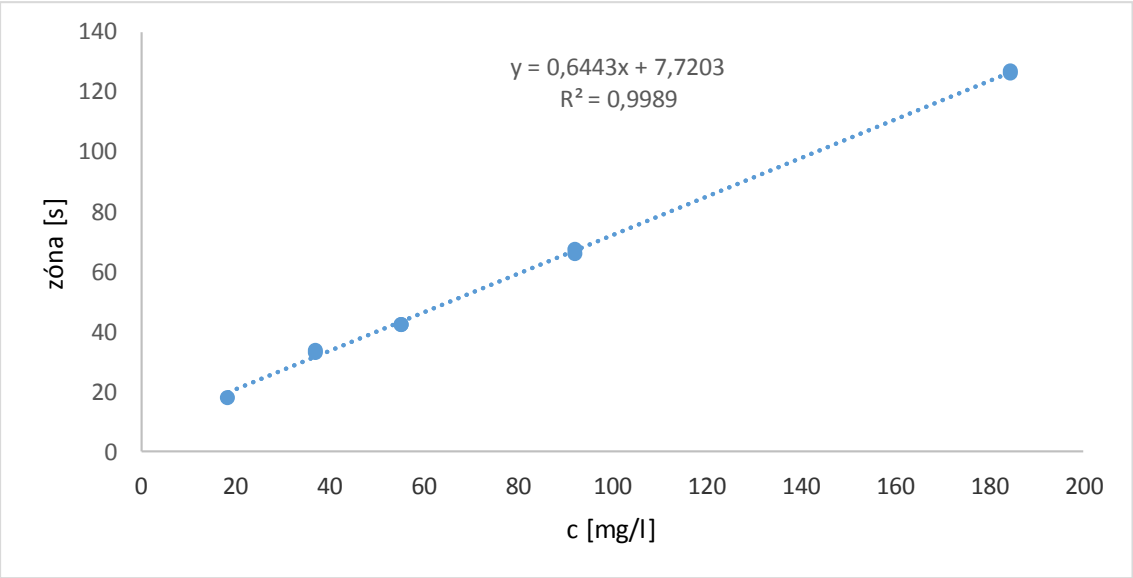
9 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ITP, CITP	Kapilárna izotachoforéza.
CE	Kapilárna elektroforéza.
CZE	Kapilárna zónová elektroforéza.
LE	vedúci elektrolyt.
TE	koncový elektrolyt.
RSH	Relative step hight, Je to relatívna pozícia medzi leadingom (RSH = 0) a terminálom (RSH= 1). Identifikuje analyt - jeho kvalitu.
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.
TLC	Chromatografia na tenkej vrstve.
IC	Iónová chromatografia.
SPE	extrakcia na tuhú fázu.
LLE	extrakcia z kvapaliny do kvapaliny.
PP	zrážanie proteínov.
UV/VIS	Ultrafialové a viditeľné žiarenie.
GMP	guanozín monofosfát.
IMP	inozín monofosfát.
ATP	adenozín trifosfát.
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid.
LOD	Limit detekcie.
LOQ	Limit kvantifikácie.
RSD	opakovateľnosť.
VWD	spektrofotometer s jednou pevnou prípadne voliteľnou vlnovou dĺžkou.
DAD	detektor diódového poľa.
EA	elektroforetický analyzátor.
V	volty.
HV	vysoké napätie.
A	amper.
VA	voltamper.
CE 1	Rezervoár pre kolónu 1.
CE 2	Rezervoár pre kolónu 2.
In column 1	otvor pre injekčnú striekačku na premytie vodiacim elektrolytom kolónu 1.
In column 2	otvor pre injekčnú striekačku na premytie vodiacim elektrolytom kolónu 2.
N.D.	pod medzí detekcie.
VÚPS	Výzkumný ústav pivovarský a sladarský.

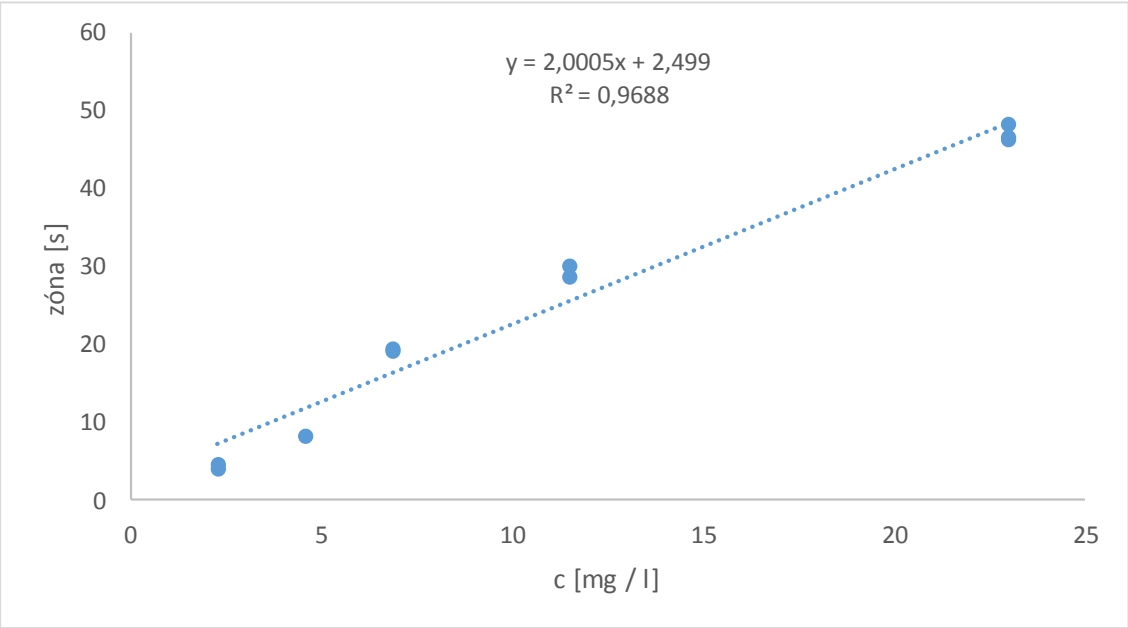
10 PRÍLOHY

10.1 Stanovenie organických kyselín pomocou kapilárnej izotachoforézy

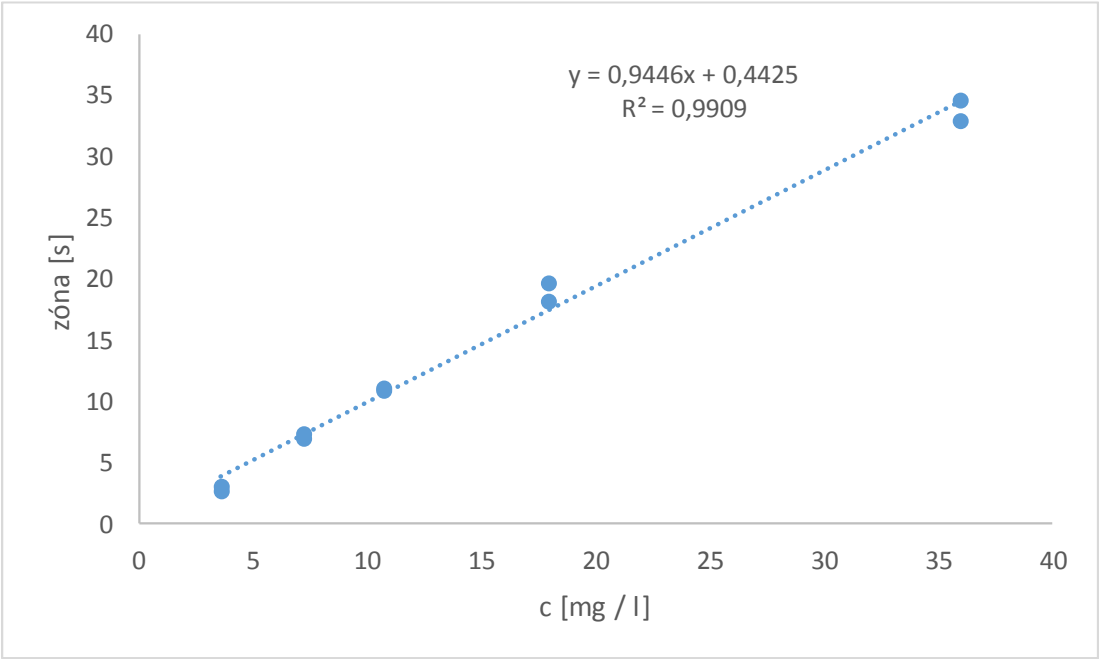
10.1.1 Kalibračné krivky organických kyselín



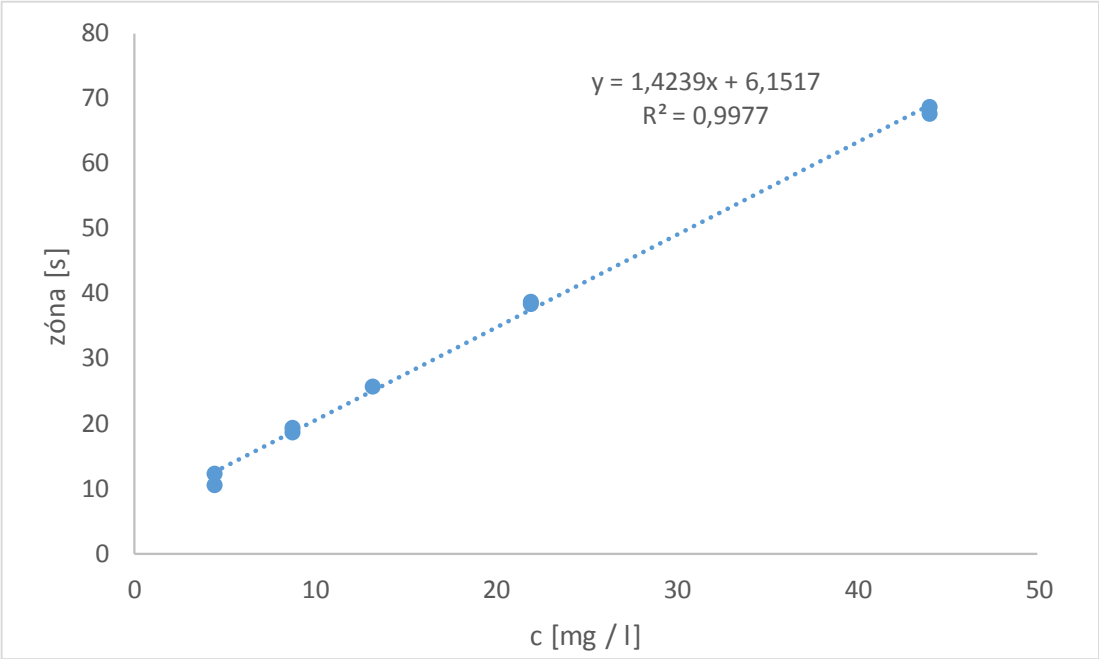
Obr. 14: Kalibračná krivka pre kyselinu mliečnu.



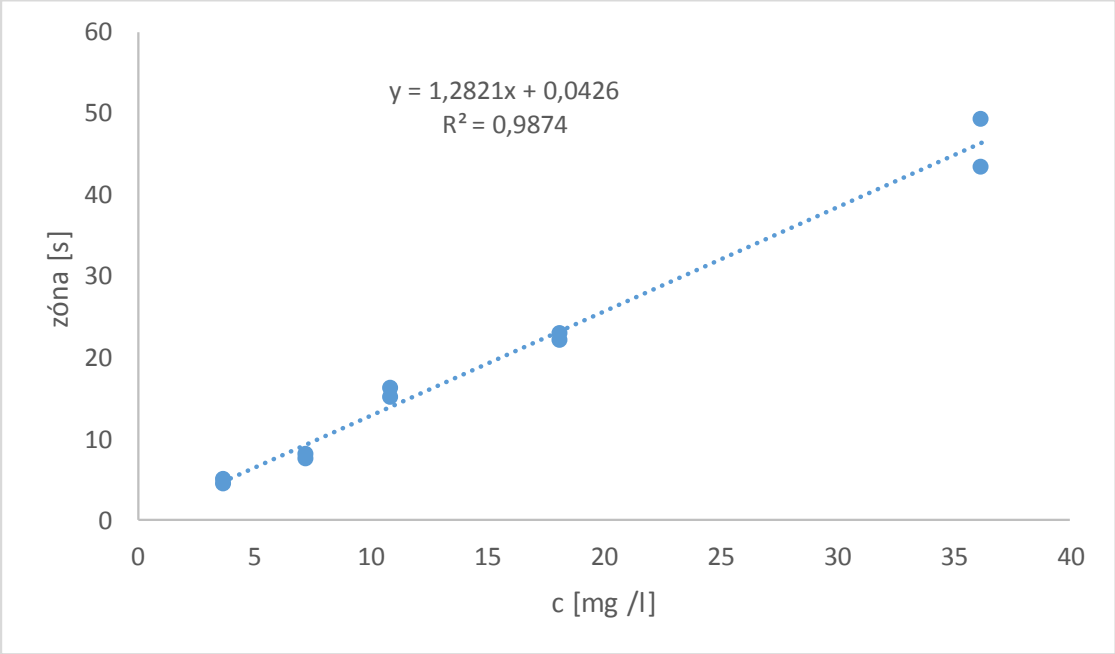
Obr. 15:Kalibračná krivka pre kyselinu šťaveľovú.



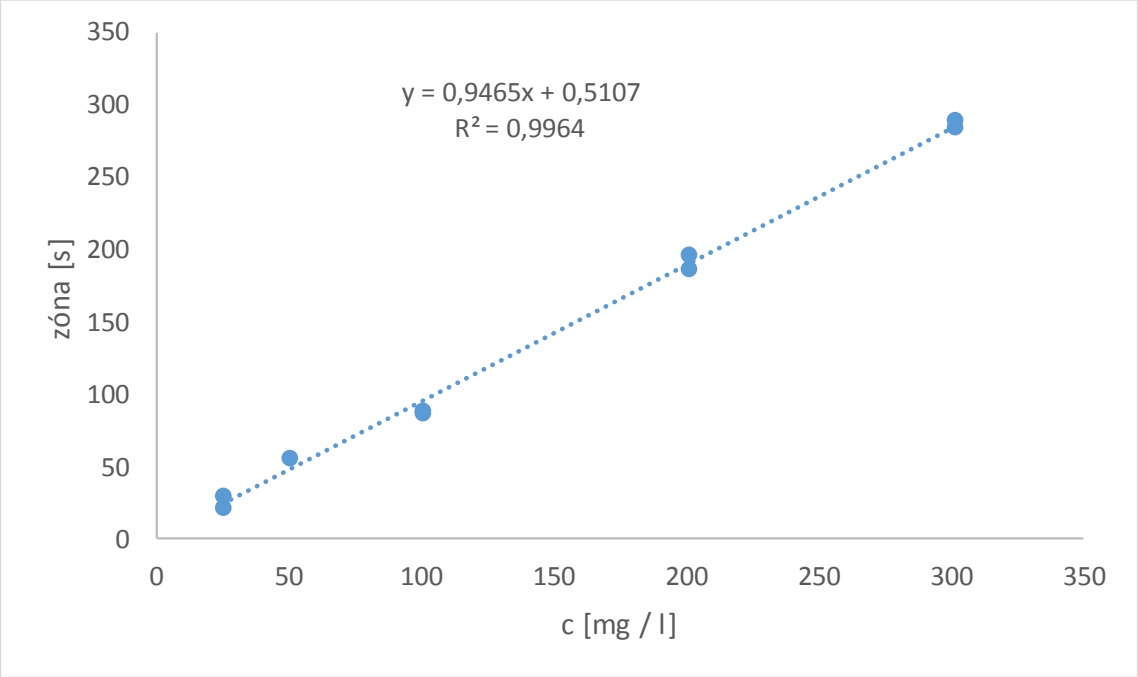
Obr. 16: Kalibračná krivka pre kyselinu citrónovú.



Obr. 17:Kalibračná krivka pre kyselinu octovú.



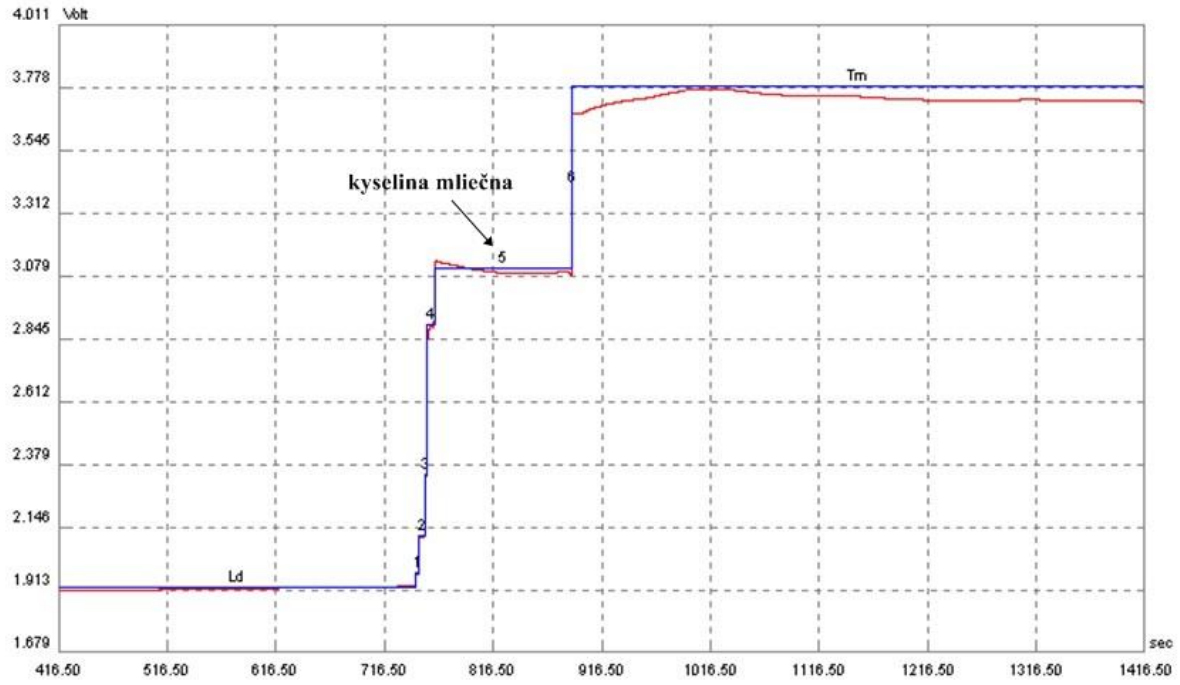
Obr. 18: Kalibračná krivka pre kyselinu jantárovú.



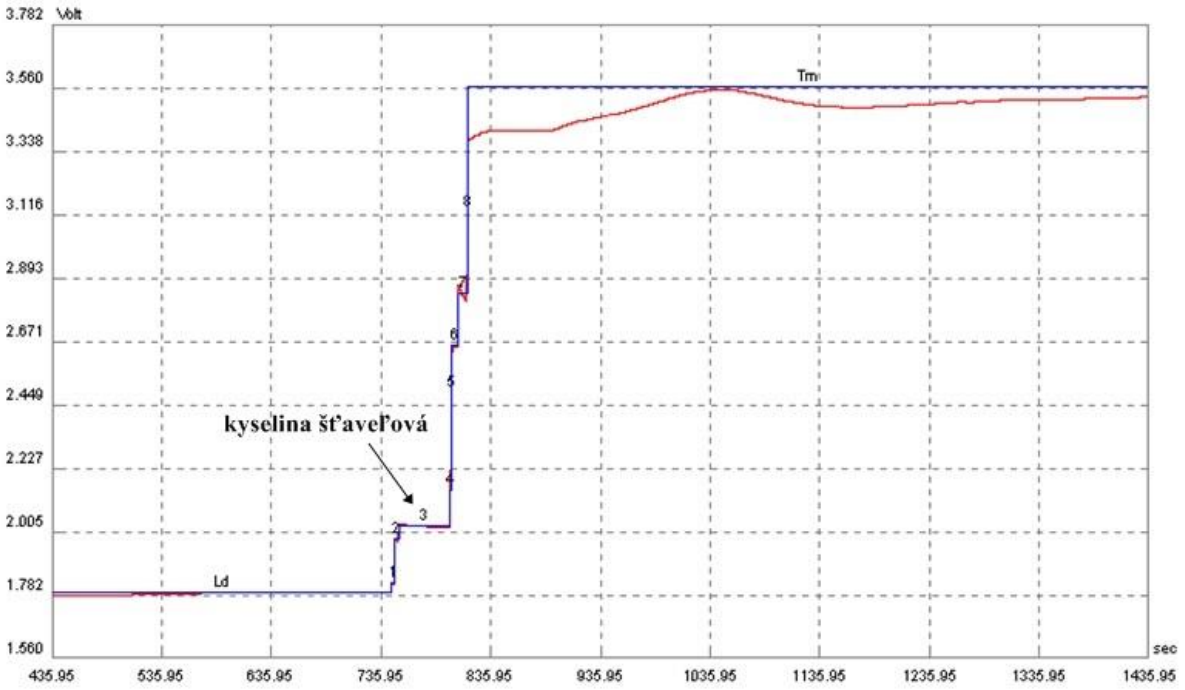
Obr. 19: Kalibračná krivka pre kyselinu benzoovú.

10.1.2 Izotachoforegramy štandardov

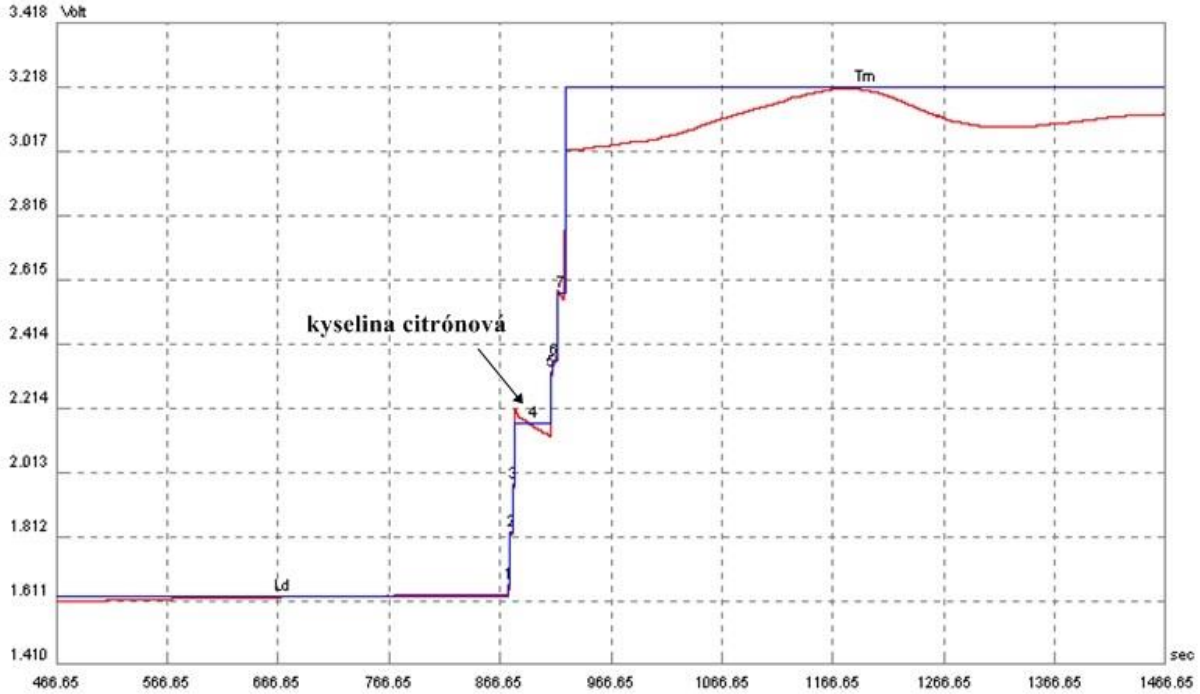
Pre vizuálnu ukážku všetkých 6 organických kyselín, boli priložené izotachoforegramy (viď. Obr. 20 - Obr. 25) ich štandardu č. 5, ktorý tvorí posledný bod kalibračnej krivky.



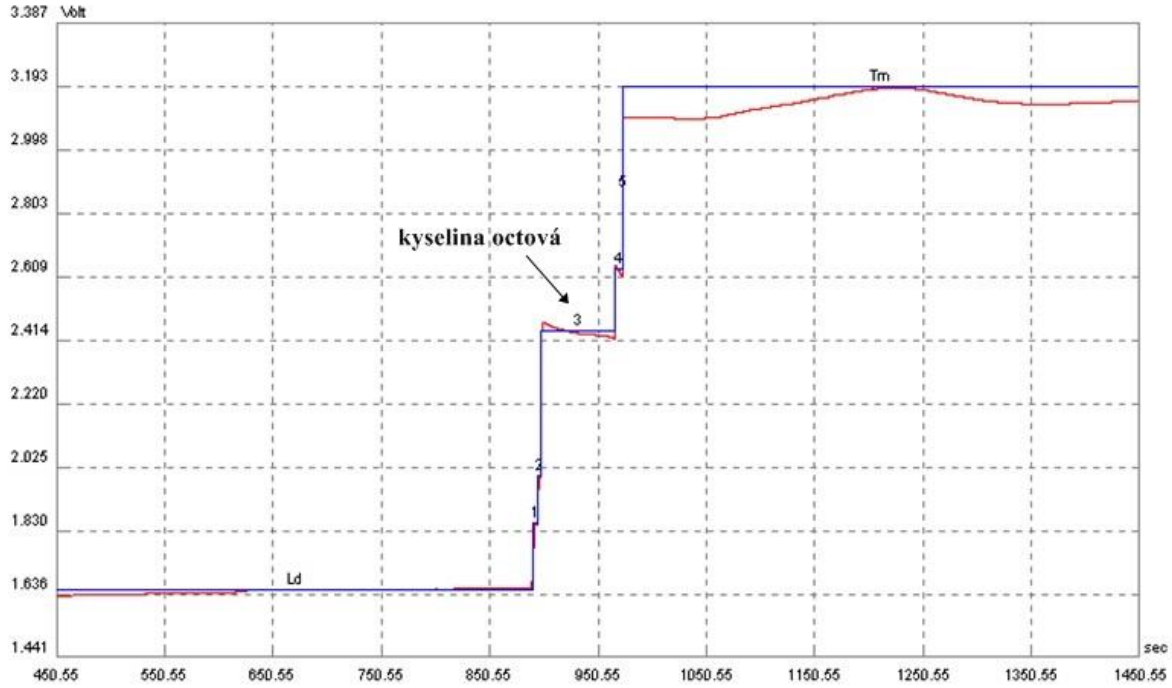
Obr. 20: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu mliečnu.



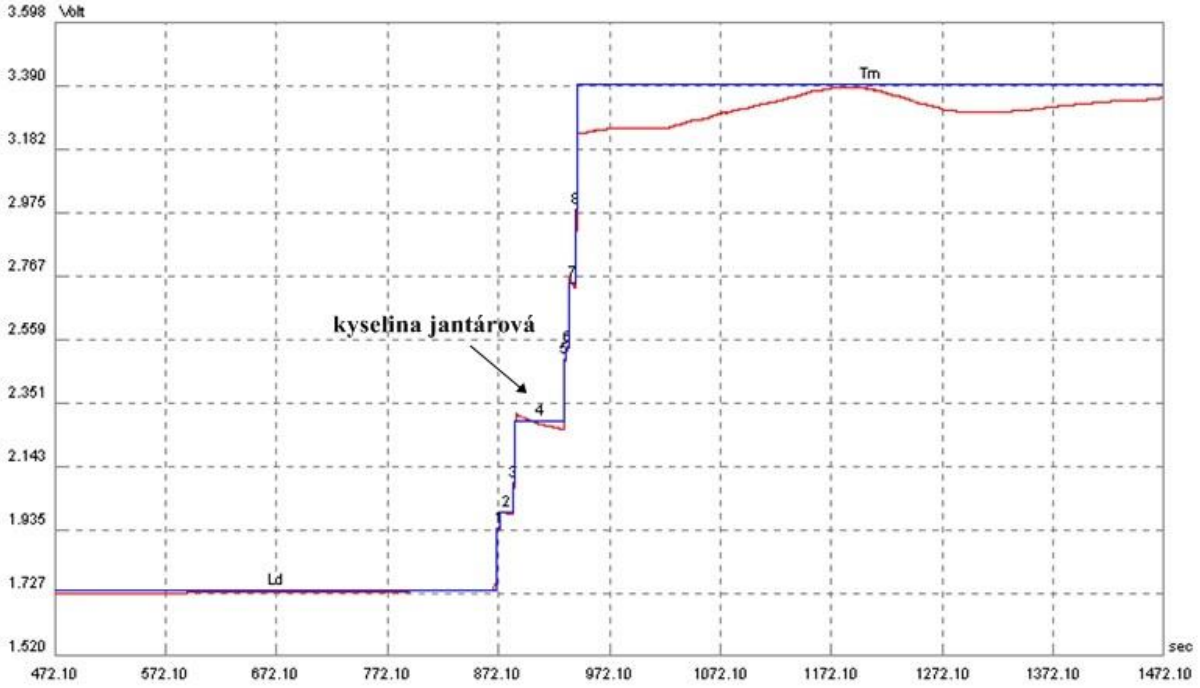
Obr. 21: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu šťaveľovú.



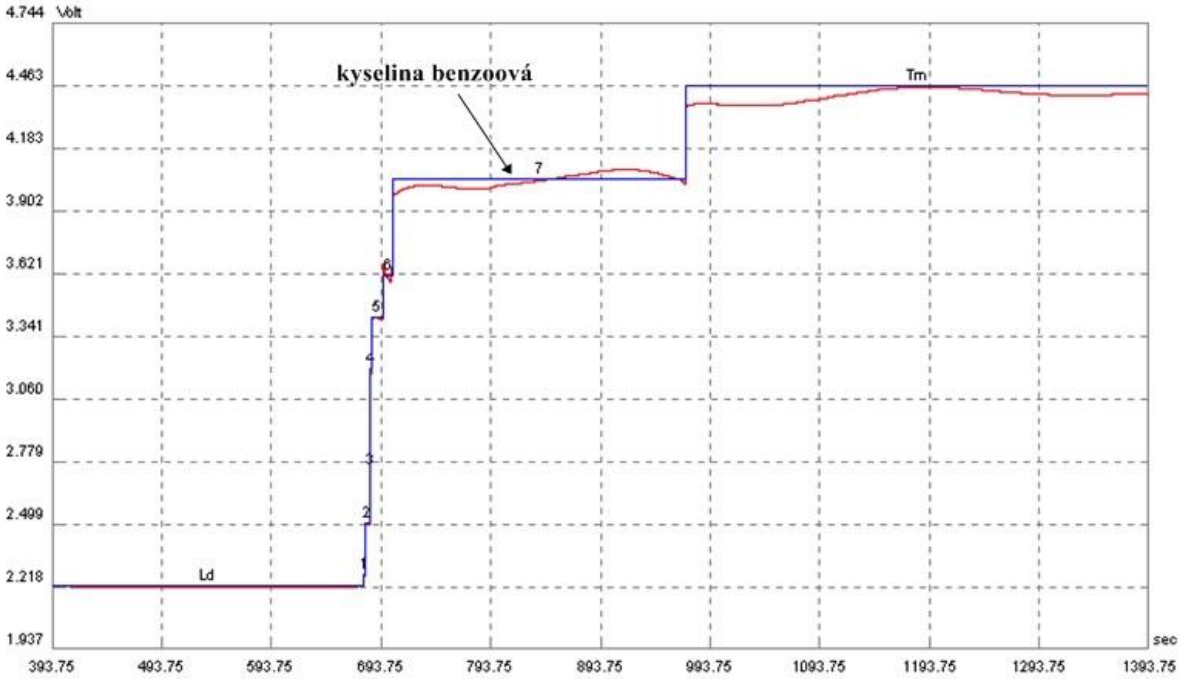
Obr. 22: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu citrónovú.



Obr. 23: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu octovú.



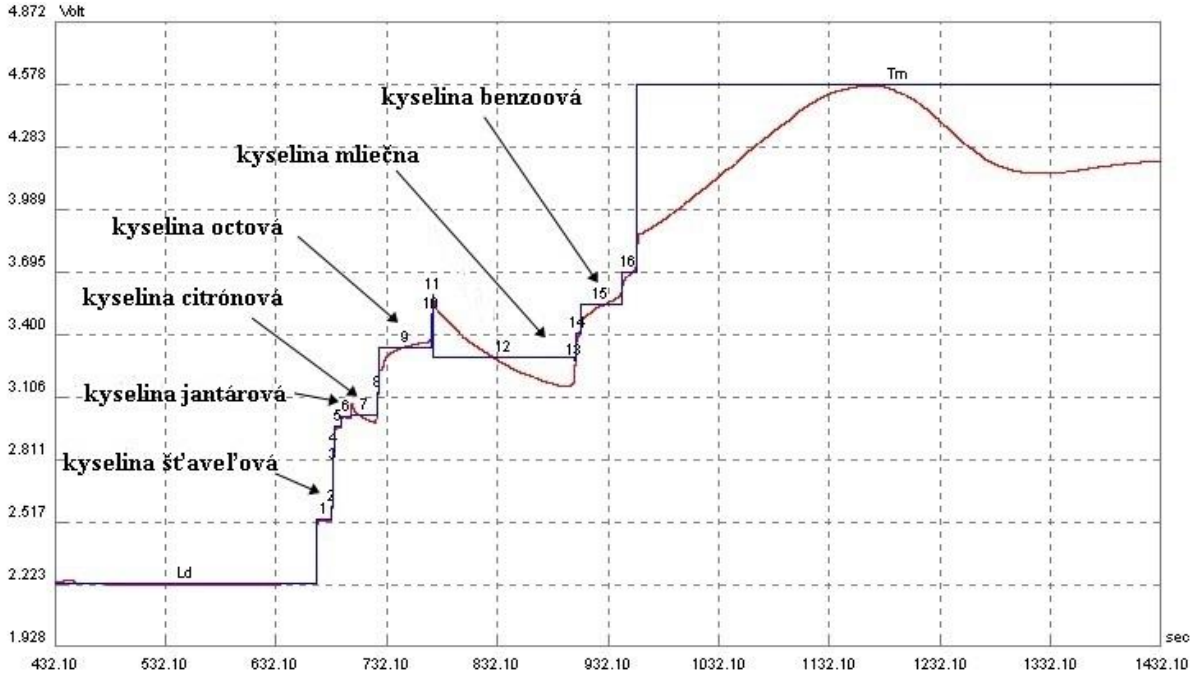
Obr. 24: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu jantárovú.



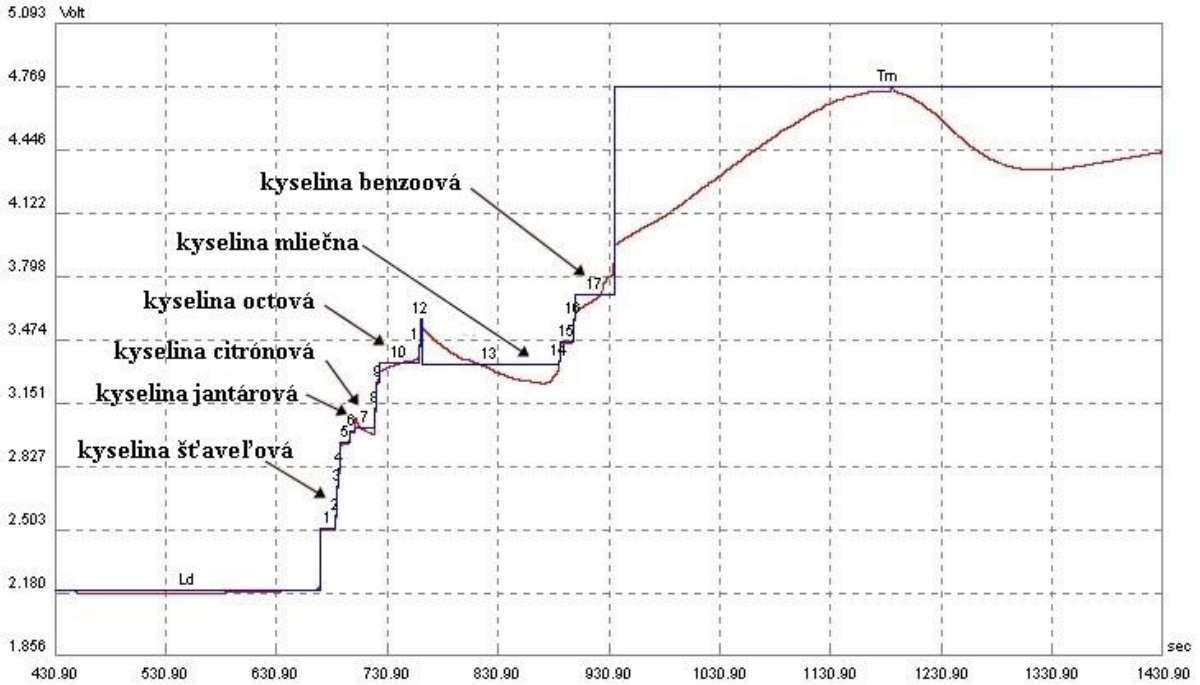
Obr. 25: Izotachoforegram štandardu č. 5 pre kyselinu benzoovú.

10.1.3 Izotachoforegramy vzoriek zo sady 11 pív

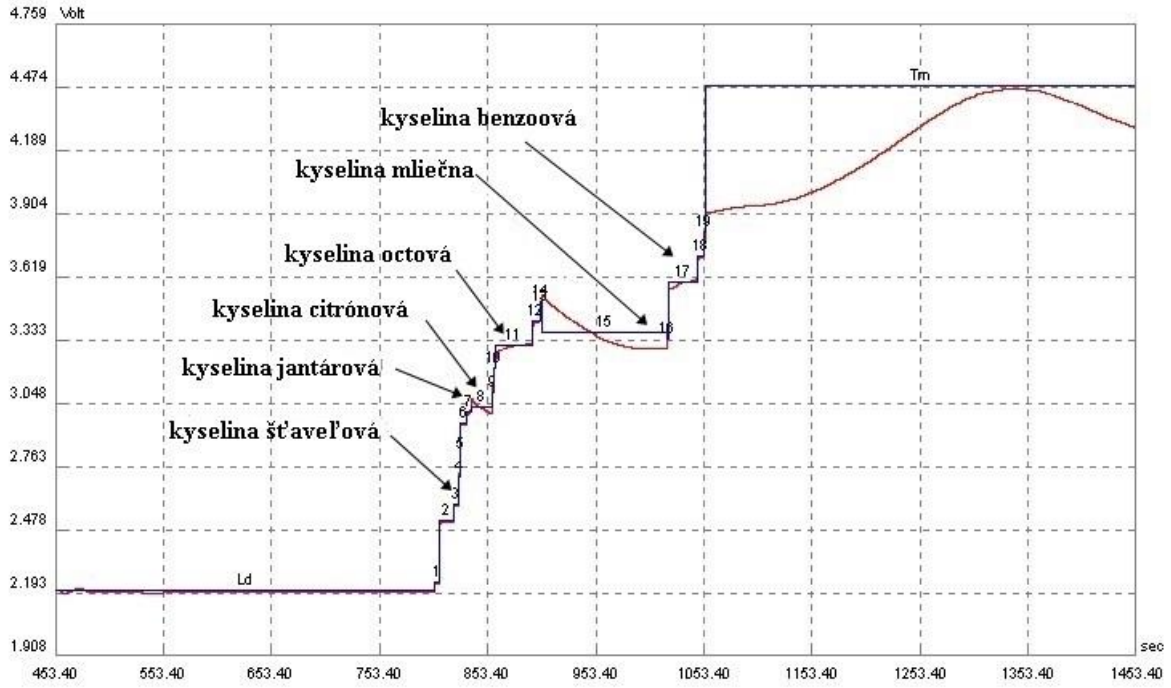
Vo vzorkách všetkých 11 pív bol stanovený obsah 6 organických kyselín a to kyseliny mliečnej, šťaveľovej, citrónovej, octovej, jantárovej a benzoovej. Výsledkom analýzy organických kyselín pomocou izotachoforézy je záznam nazývaný izotachoforegram. Izotachoforegramy pre všetkých 11 vzoriek pív sú uvedené na Obr. 26 - Obr. 36.



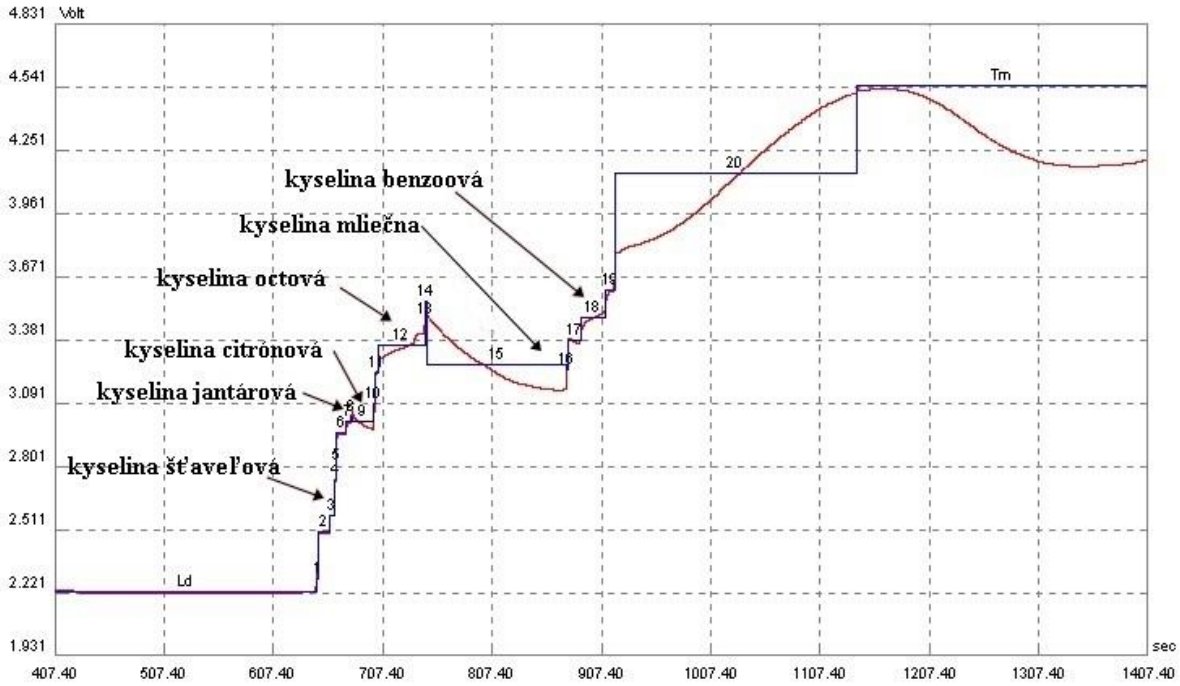
Obr. 26: Izotachoforegram vzorku piva č. 1.



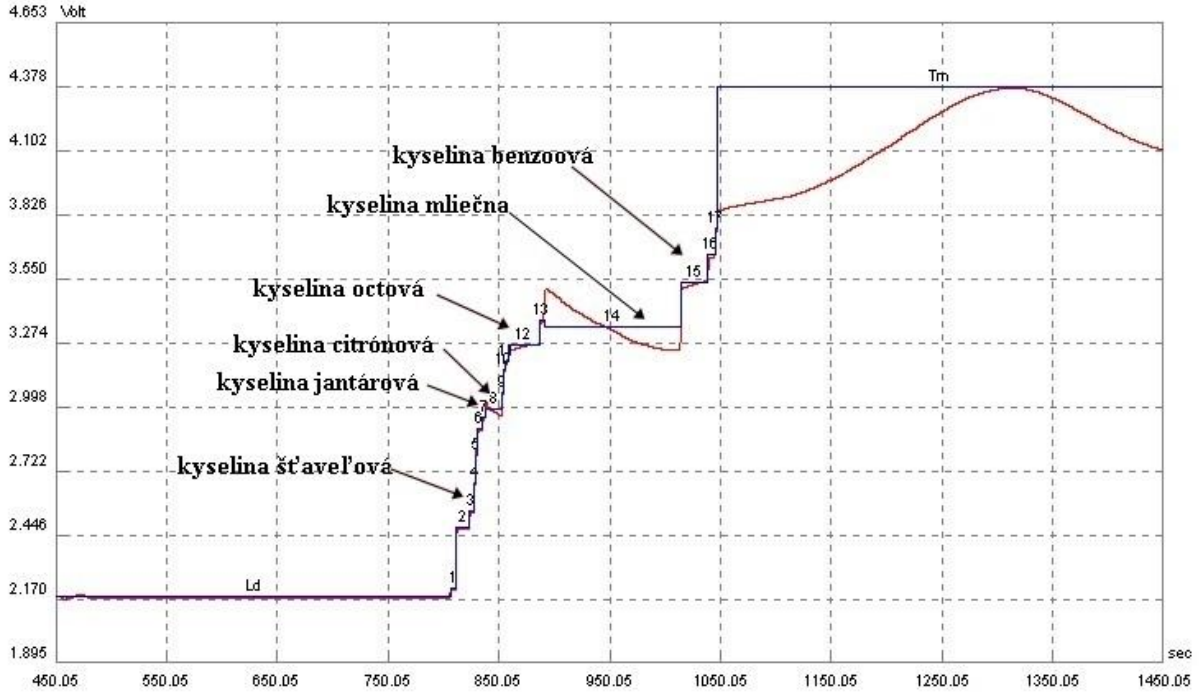
Obr. 27: Izotachoforegram vzorku piva č. 2.



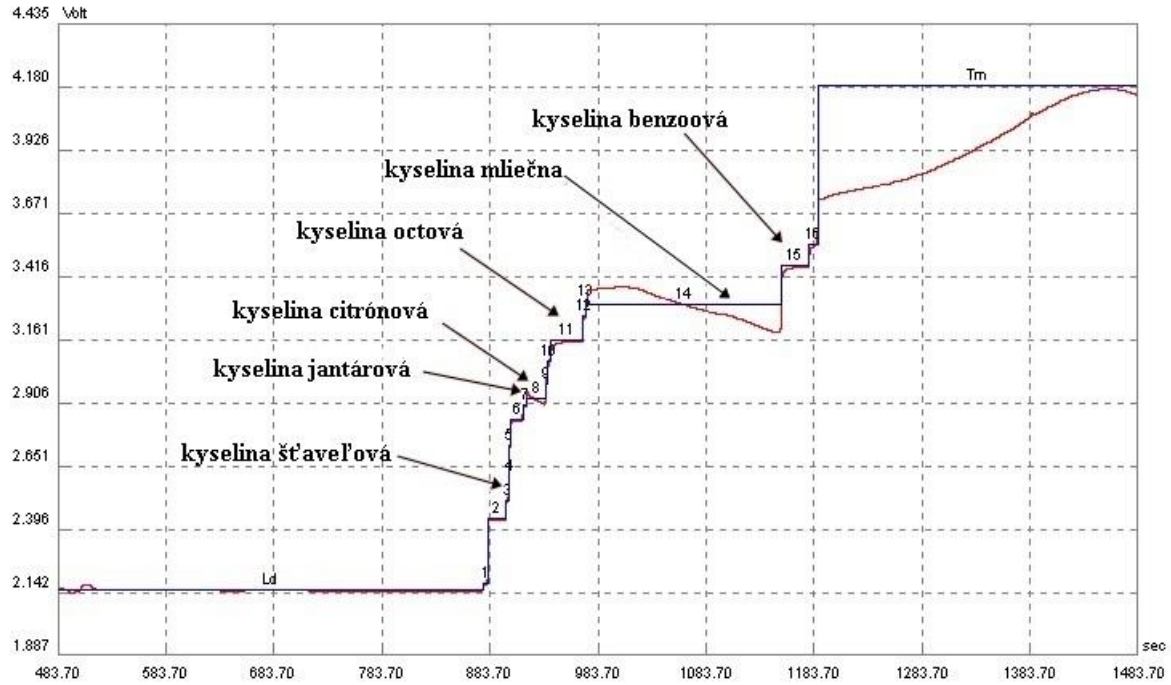
Obr. 28: Izotachoforegram vzorku piva č. 3.



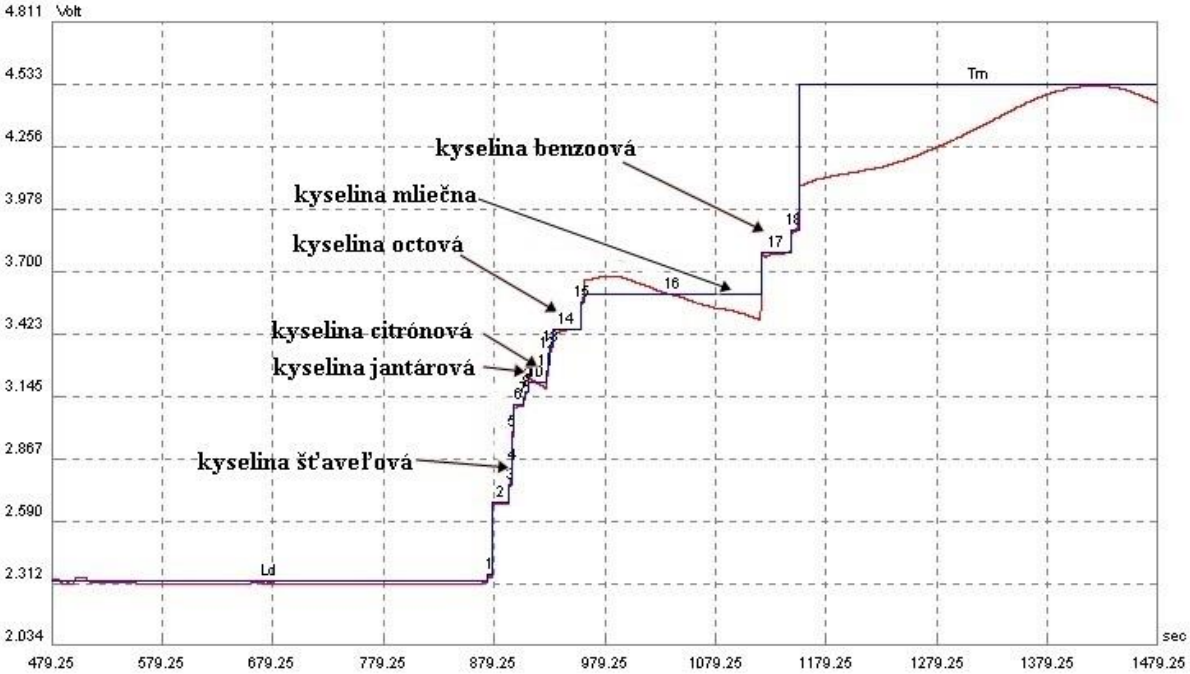
Obr. 29: Izotachoforegram vzorku piva č. 4.



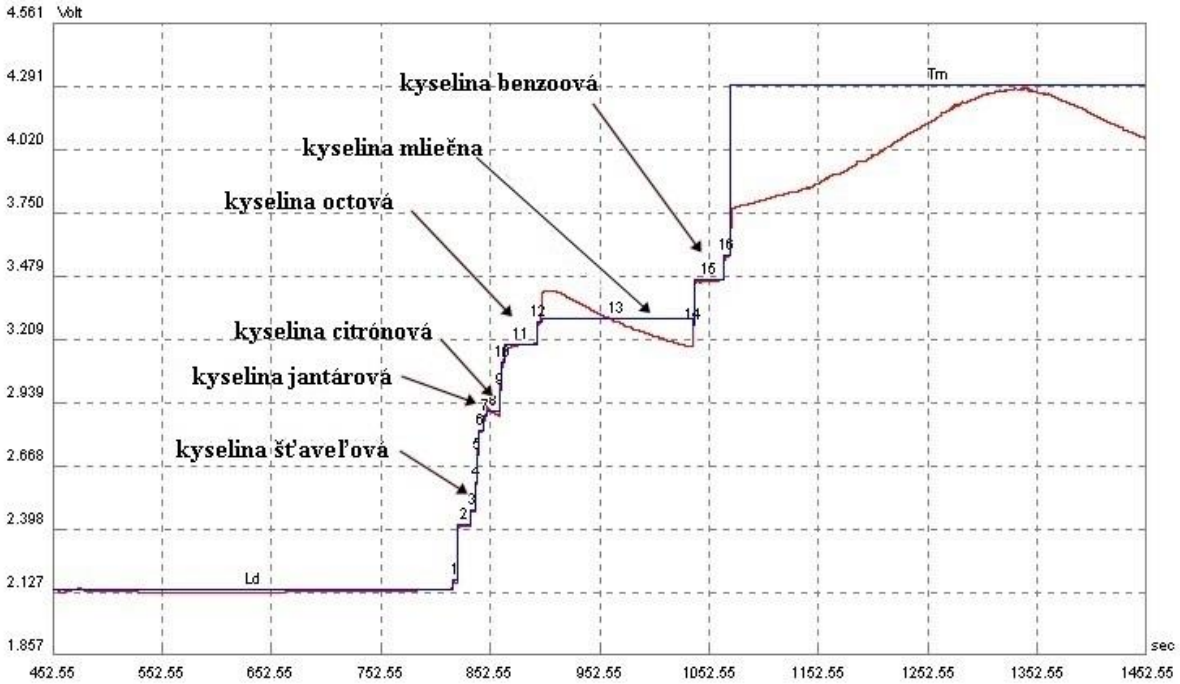
Obr. 30: Izotachoforegram vzorku piva č. 5.



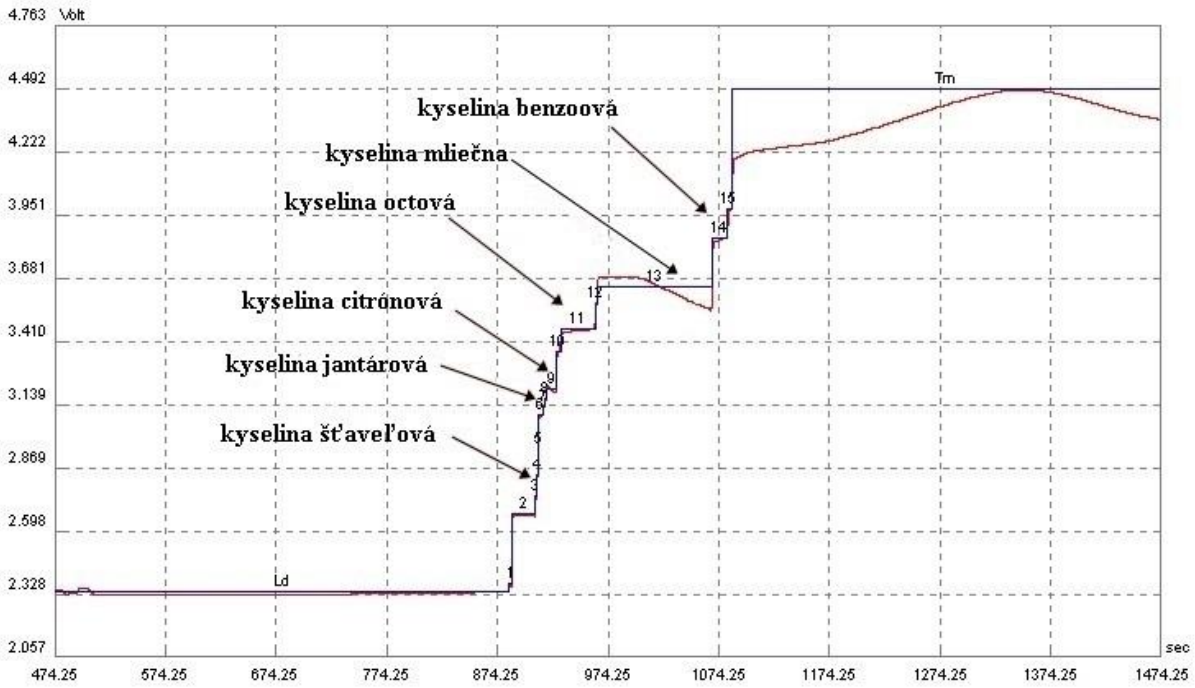
Obr. 31:Izotachoforegram vzorku piva č. 6.



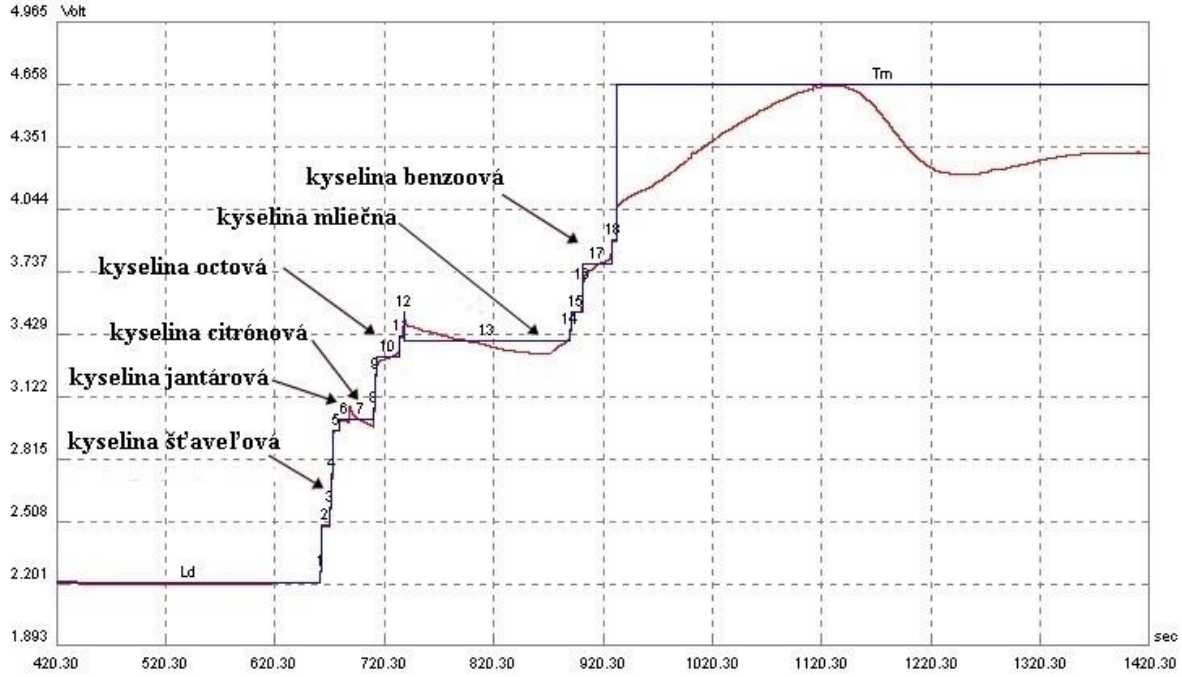
Obr. 32: Izotachoforegram vzorku piva č. 7.



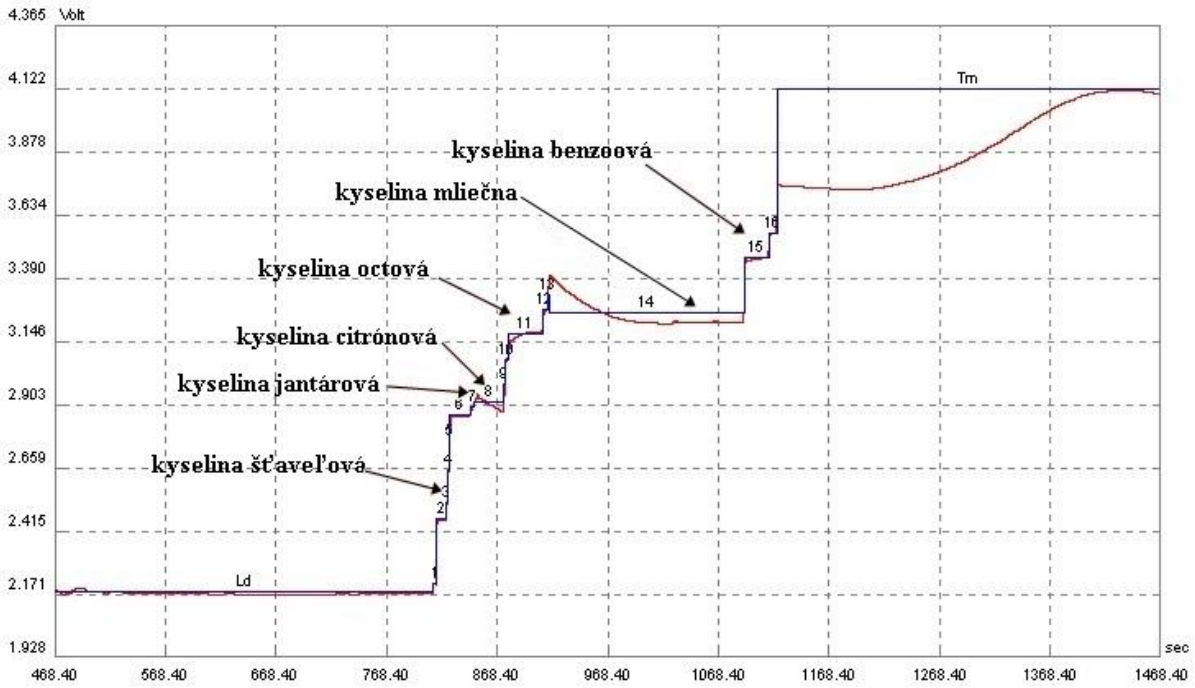
Obr. 33: Izotachoforegram vzorku piva č. 8.



Obr. 34: Izotachoforegram vzorku piva č. 9.



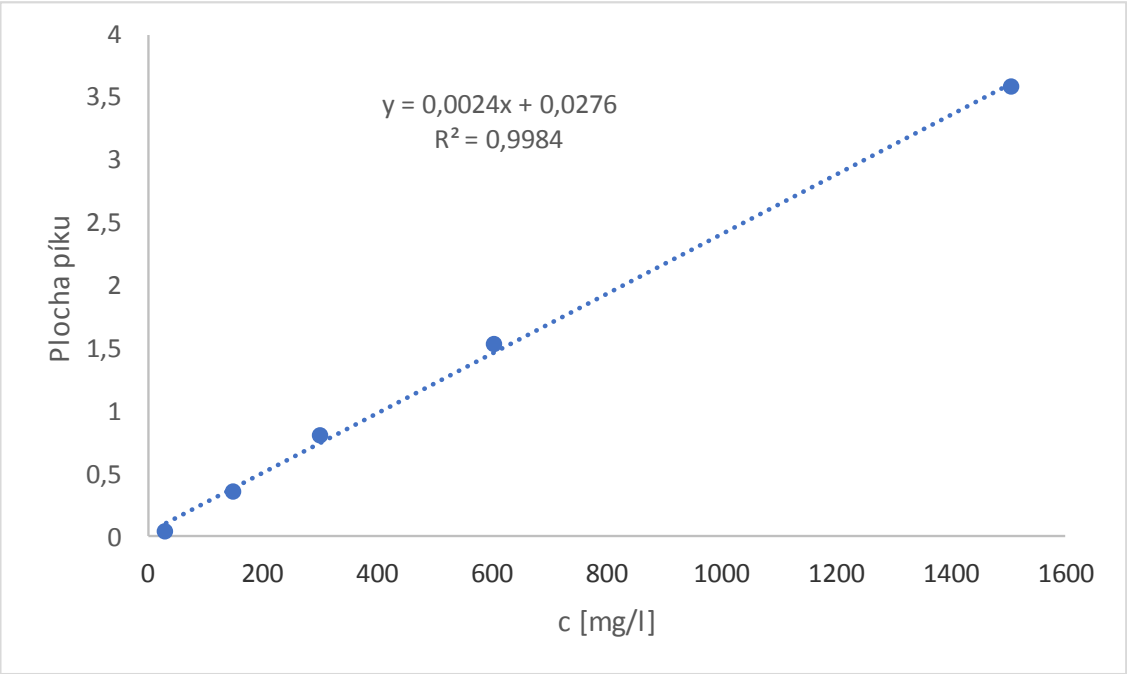
Obr. 35:Izotachoforegram vzorku piva č. 10.



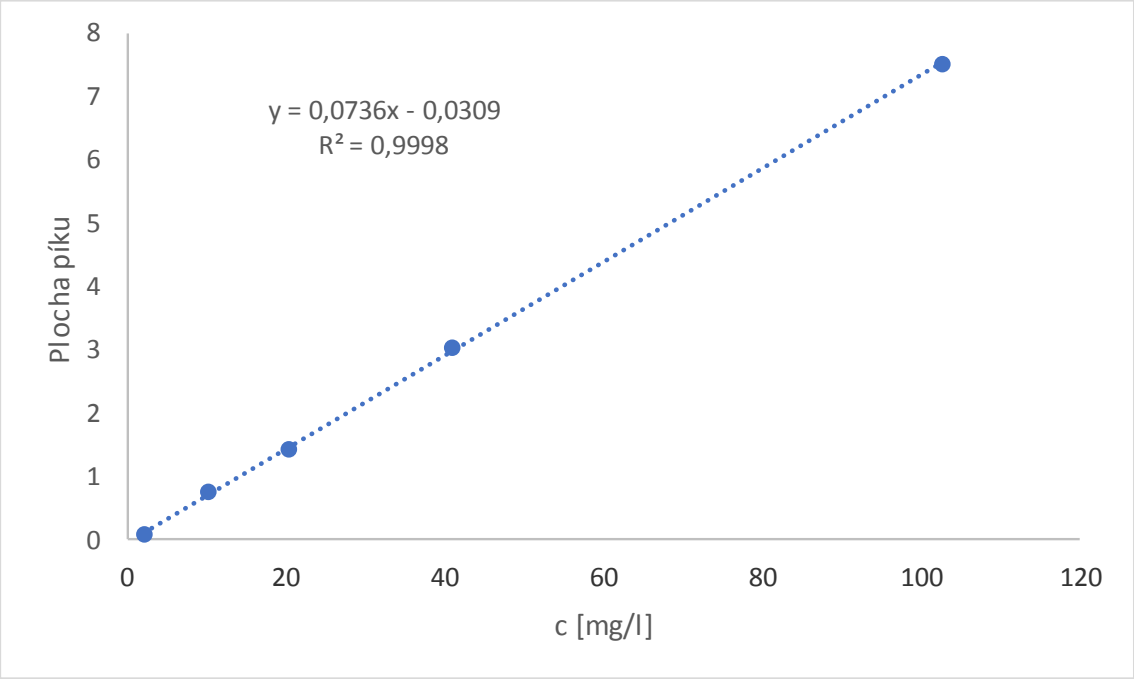
Obr. 36: Izotachoforegram vzorku piva č. 11.

10.2 Stanovenie organických kyselín pomocou HPLC/UV

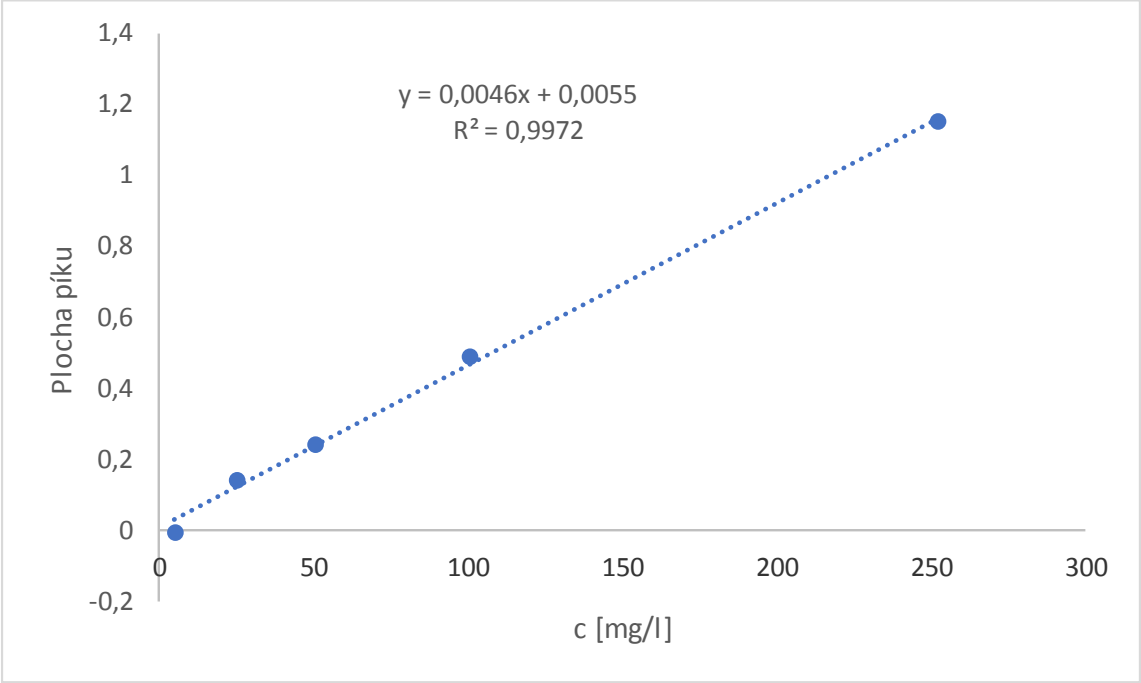
10.2.1 Kalibračné krivky organických kyselín



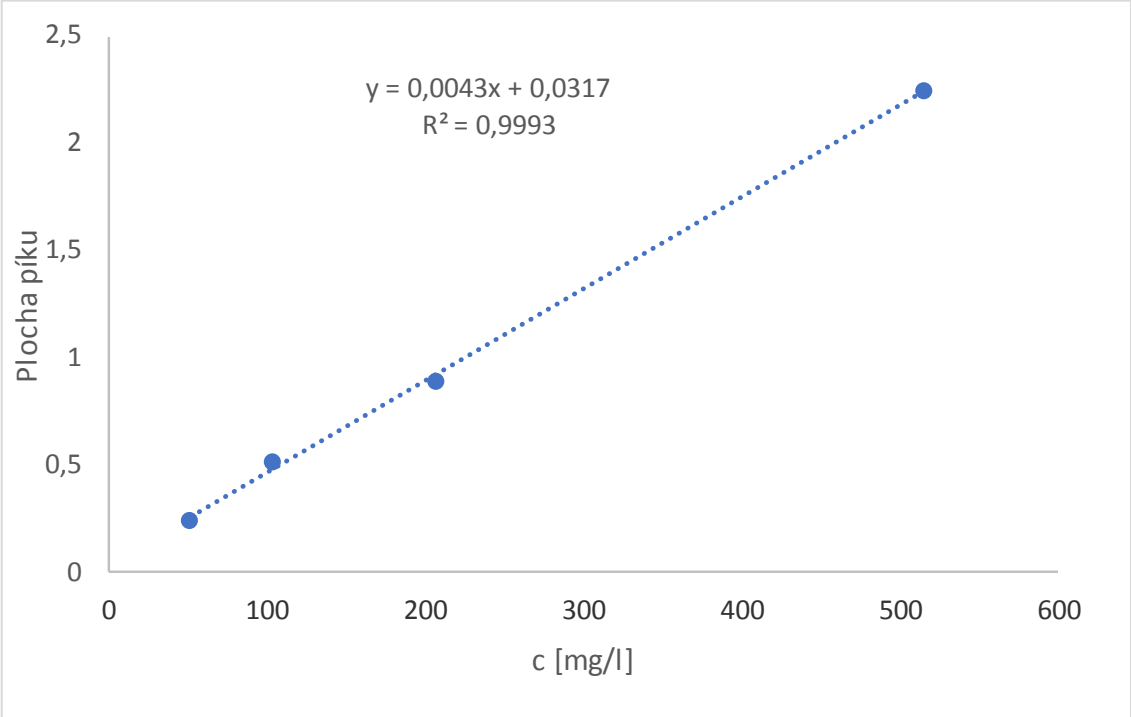
Obr. 37: Kalibračná krivka pre kyselinu mliečnu.



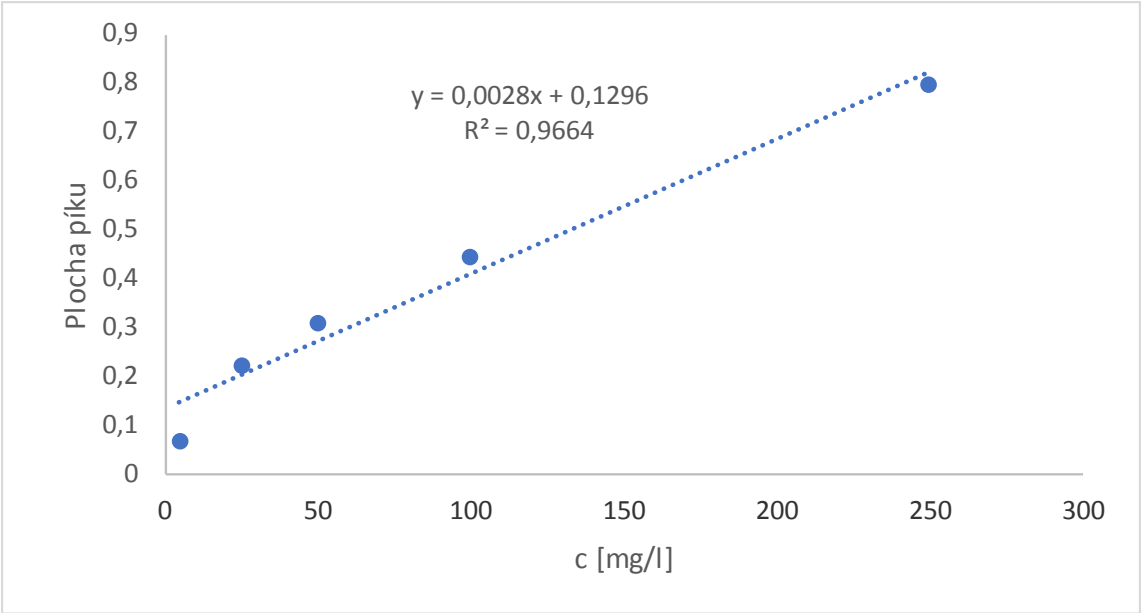
Obr. 38: Kalibračná krivka pre kyselinu šťaveľovú.



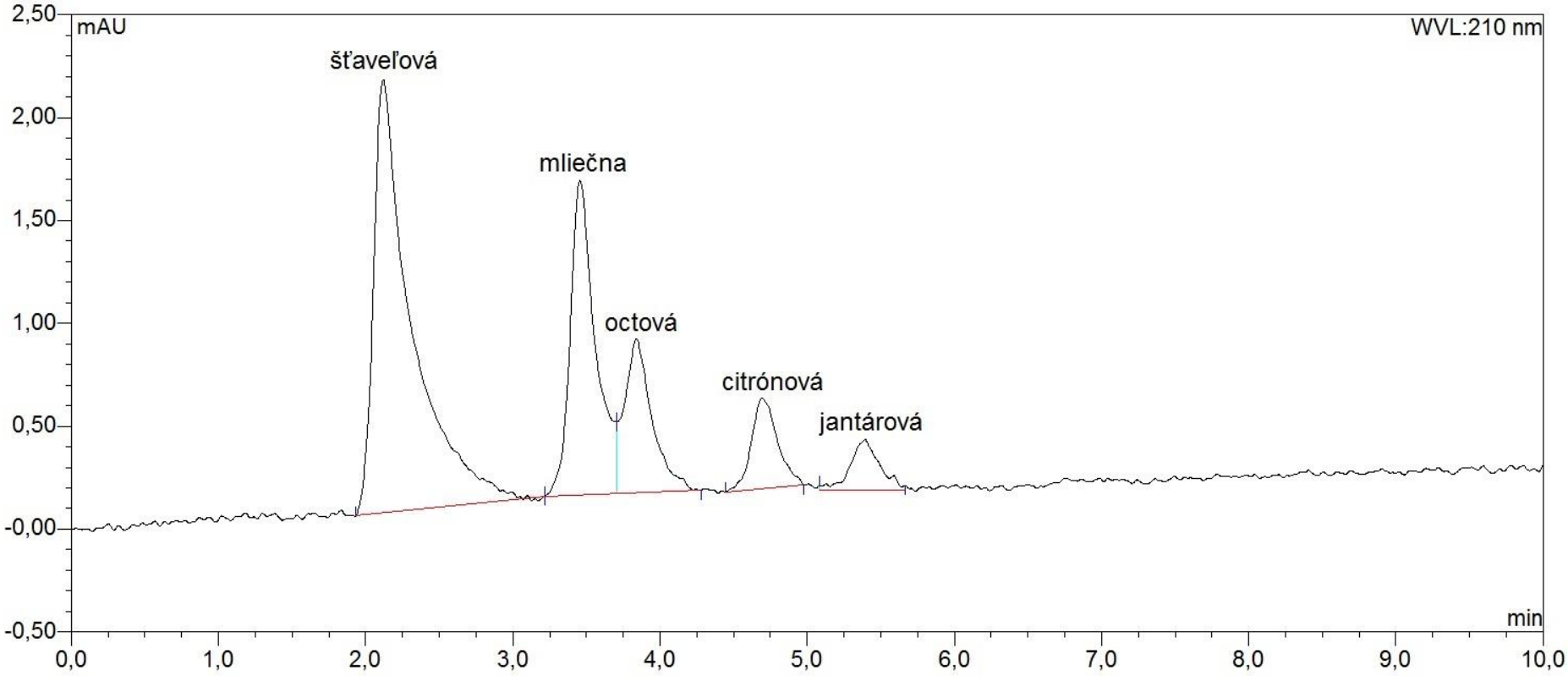
Obr. 39: Kalibračná krivka pre kyselinu citrónovú.



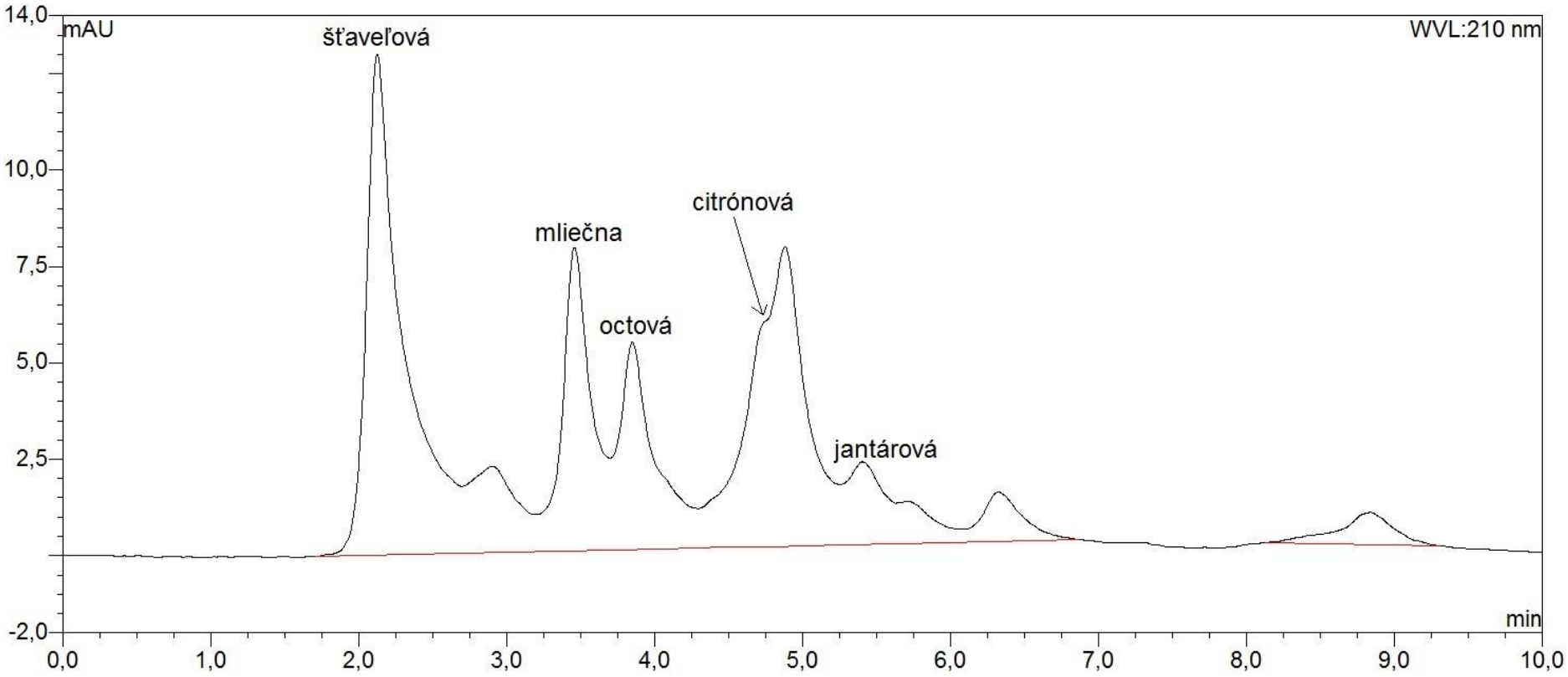
Obr. 40: Kalibračná krivka pre kyselinu octovú.



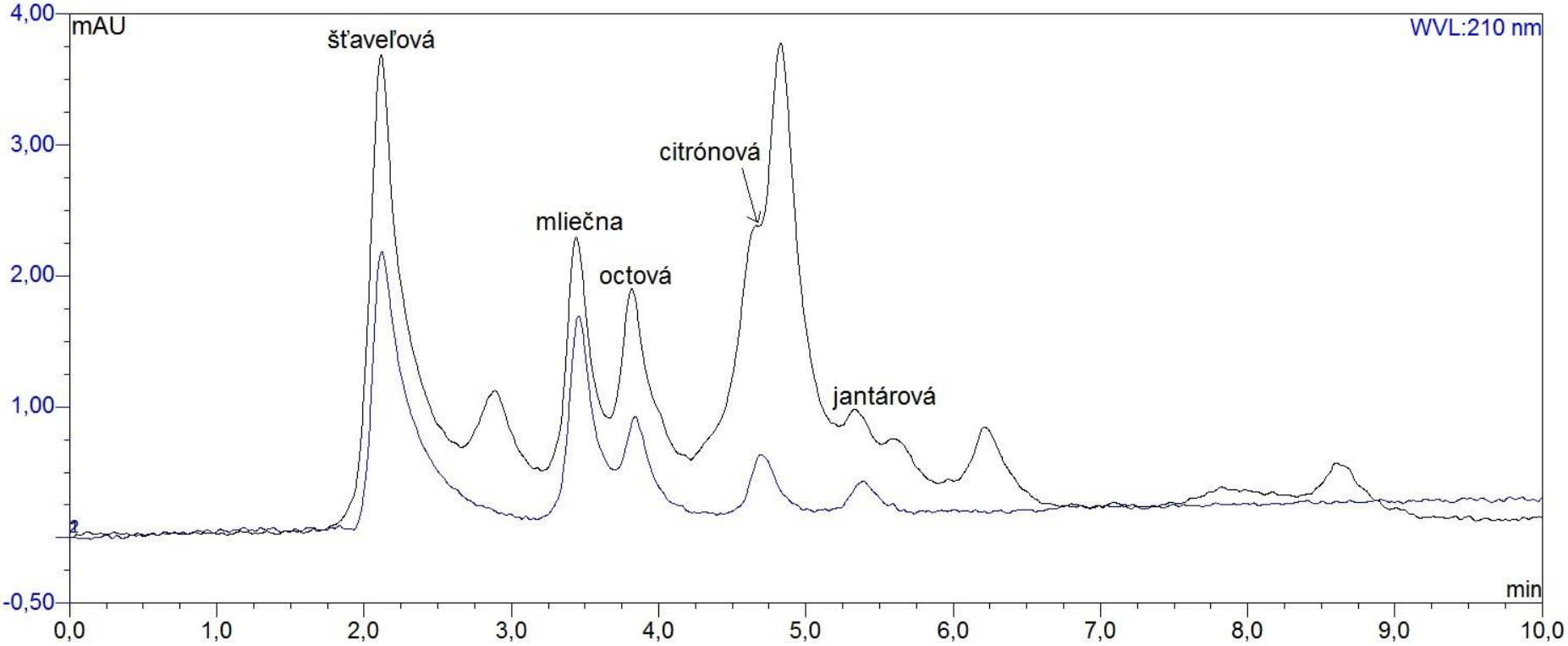
Obr. 41: Kalibračná krivka pre kyselinu jantárovú.



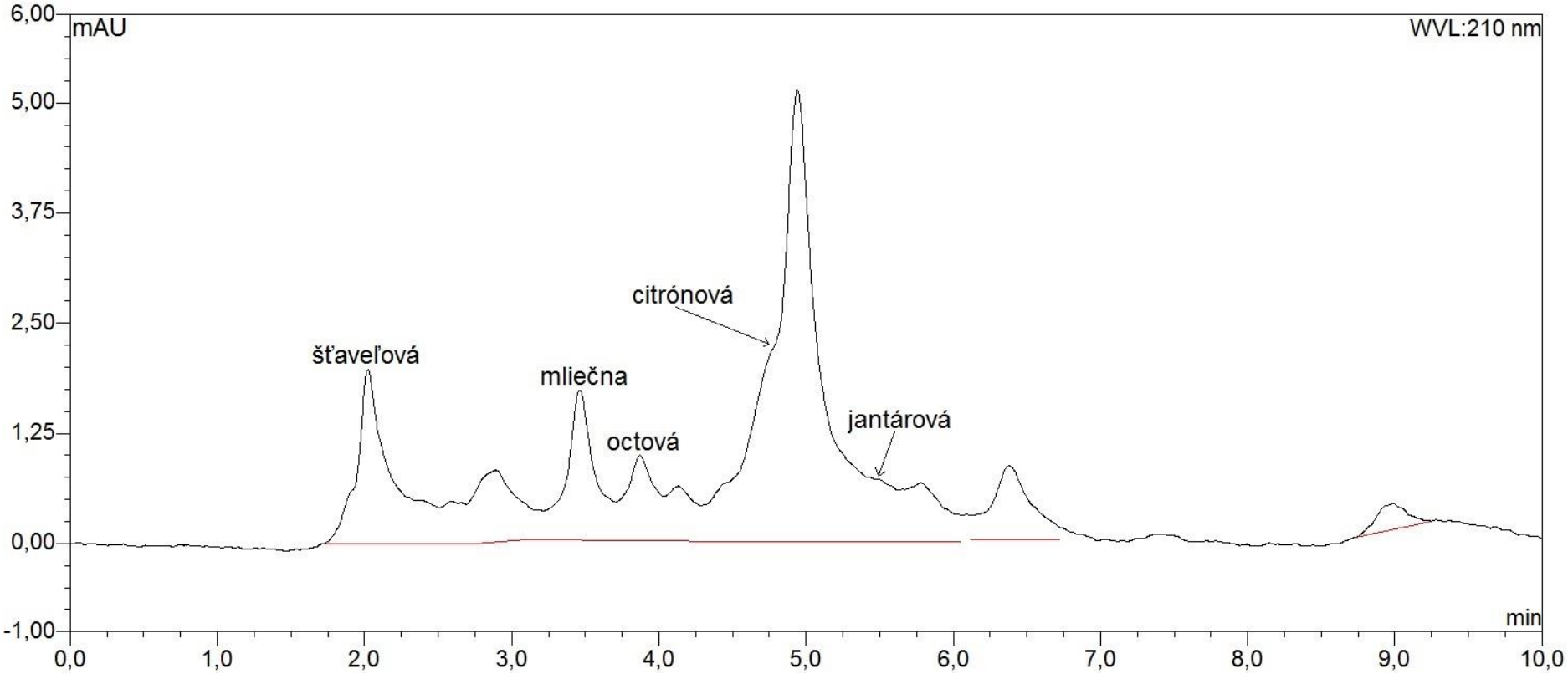
Obr. 42:Chromatogram zmiešaného štandardu.



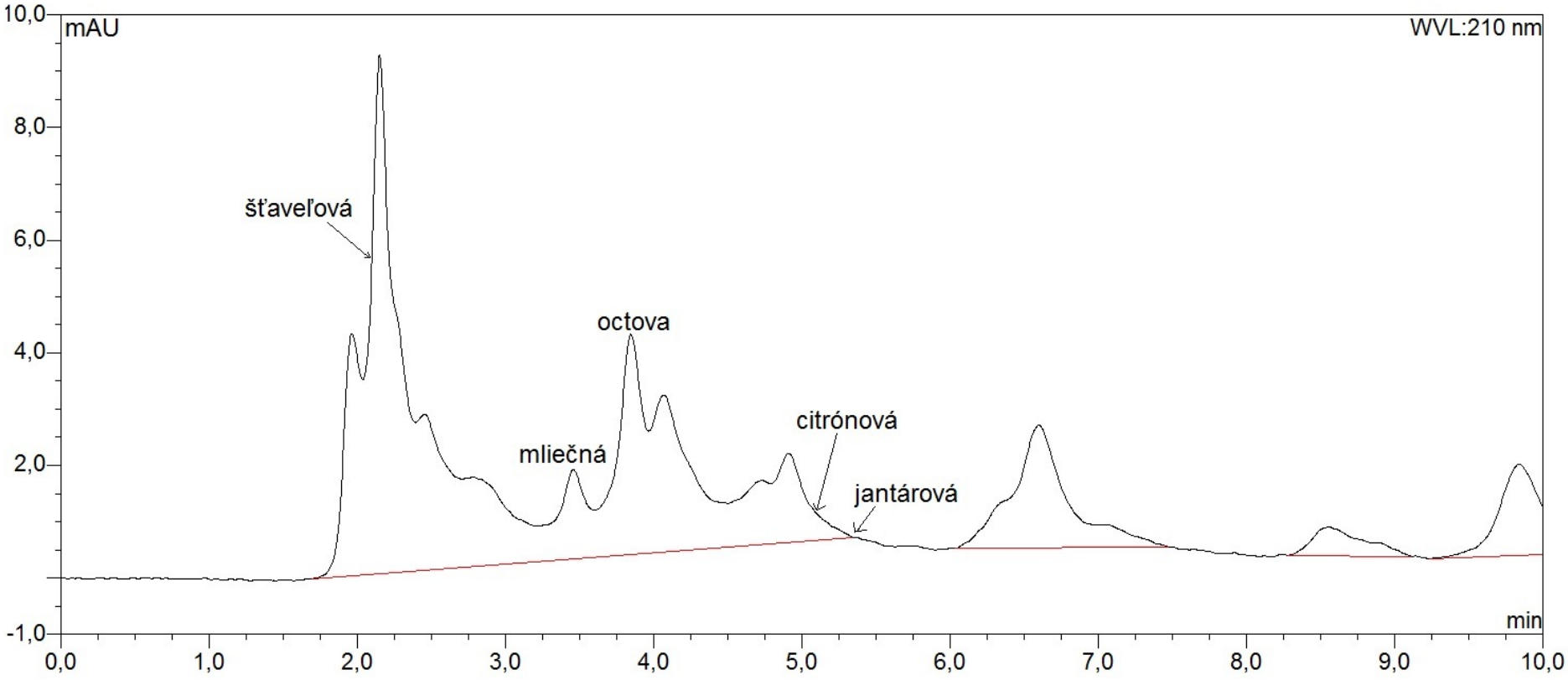
Obr. 43: Chromatogram zmiešaného štandardu z kalibrácie do matrice.



Obr. 44: Chromatogram zmiešaného štandardu bez matrice, preložený chromatogramom zmiešaného štandardu s matricou.



Obr. 45: Chromatogram vzorky piva po úprave extrakciou SPE.



Obr. 46: Chromatogram vzorky piva bez úpravy extrakciou SPE.