

## **Stanovenie organických kyselín v ovocných šťavách a nektároch metódou HPLC**

ELENA BELAJOVÁ - MILAN SUHAJ

**SÚHRN.** Opisuje sa metóda HPLC na reverznej fáze na separáciu a stanovenie kyseliny L-askorbovej (KA), citrónovej (KC), jantárovej (KJ) a fumárovej (KF) v ovocných šťavách a nektároch. Uvedená metóda sa validovala a použila na hodnotenie kvality niektorých komerčných ovocných štiav a nektárov prostredníctvom chromatografického profilu prítomných organických kyselín. Detekčný limit bol  $0,80 \text{ mg.dm}^{-3}$  pre KA,  $20 \text{ mg.dm}^{-3}$  pre KC,  $10 \text{ mg.dm}^{-3}$  pre KJ a  $0,025 \text{ mg.dm}^{-3}$  pre KF. Relatívna smerodajná odchýlka (RSD) opakovateľnosti bola nižšia ako 0,32 % pre  $n = 6$  a rozšírená neistota merania s koeficientom pokrytia 2 sa pohybovala od 2,44 do 5,80 %. Chromatografická separácia kyselín trvala 6 minút. Koncentrácie jednotlivých kyselín v 100% citrusových šťavách sa porovnali s referenčnými hodnotami, ktoré reprezentujú kritériá pre autentifikáciu ovocných štiav v Nemecku.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** organické kyseliny; ovocné šťavy; ovocné nektáre, HPLC

Hodnotenie kvality a pravosti ovocných štiav, nektárov a nealkoholických nápojov vyžaduje definovanie kritérií pravosti ich zloženia. Kritériá bližšie určujú, aké zložky majú obsahovať autentické šťavy. V rámci legislatívy EÚ je v súčasnosti platné nariadenie 93/77/EEC pre ovocné šťavy a produkty z nich, ktoré okrem charakteristík pre čerstvé ovocie, ovocné pyré, čerstvú a koncentrovanú šťavu, ovocné nektáre a šťavy v prášku obsahuje aj postupy pre ich výrobu a spracovanie a špecifikuje prídavky povolených aditív [1]. Mnohé krajiny používajú v rámci svojich národných legislatív vlastné kritériá na charakterizáciu zloženia pravých ovocných štiav.

V Európe navrhuje organizácia AIJN (Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables) pre šťavy normy, ktoré sú najlepším kompromisom záujmov členských štátov EEC. V Slovenskej republi-

---

Ing. Elena BELAJOVÁ, Ing. Milan SUHAJ, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. Box 25, 824 75 Bratislava 26.

Korešpondujúci autor: Ing. Elena BELAJOVÁ, e-mail: elena.belajova@vup.sk

ke platí Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR pre hlavu Potravinového kódexu SR upravujúcu nápoje, ktorá obsahuje požiadavky na zloženie a povolené koncentrácie prídavných látok do ovocných a zeleninových štiav a nektárov [2].

Ovocné šťavy sú bohaté na organické kyseliny. Každý druh šťavy má charakteristické profily organických kyselín, ktoré slúžia ako tzv. „fingerprinty“ na potvrdenie pravosti a hodnotenie kvality štiav. Na kvalitatívne a semikvantitatívne stanovenie organických kyselín v šťavách sa používa papierová (PC) a tenkovrstvová chromatografia (TLC), na kvantitatívne stanovenie separačné techniky plynovej (GC) a kvapalinovej chromatografie (HPLC), kapilárnej izotachografie (cITP) a kapilárnej elektroforézy (CE) [3-12], ktoré však často nepokrývajú celé spektrum najsledovanejších organických kyselín. Na stanovenie minoritnej kyseliny D-izocitrónovej, kyseliny citrónovej a kyseliny D-jablčnej v syntetickej kyseline D,L-jablčnej sa prevažne používajú enzýmové metódy (súprava firmy Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Nemecko) v spojení so spektrofotometriou [13, 14], ktorých alternatívou začínajú byť metódy kapilárnej plynovej a chirálnej kvapalinovej chromatografie [15].

Cieľom predloženej práce bolo zaviesť rýchlu a jednoduchú metódu HPLC, vhodnú na stanovenie organických kyselín, ktoré sa frekventovane vyskytujú v ovocných (prednostne citrusových) šťavách a ktoré sú smerodajné pri posudzovaní kvality štiav.

## **Materiál a metódy**

### *Prístroje*

Separácia organických kyselín sa vykonala na kvapalinovom chromatografe (Pye Unicam, Cambridge, Veľká Británia) s multikanálovým detektorom UV/VIS PU 4021 pri 214 nm, nastavená citlivosť 0,08 AUFS. Použila sa chromatografická kolóna s reverznou fázou C18, 150 × 3 mm s veľkosťou častíc sorbentu 5 µm (Tessek, Praha, ČR). Mobilná fáza bola 0,01 M kyselina fosforečná, prietok mobilnej fázy bol 0,7 ml.min<sup>-1</sup> a nástrek vzorky 20 µl. Analýza prebiehala pri laboratórnej teplote.

### *Štandardný materiál*

Kyselina vínna, čistá a L(-)-jablčná, čistá (Lachema, Brno, ČR), kyselina citrónová monohydrát, p. a. 99,8% (Lachema, Brno, ČR), kyselina jantárová p. a. 99,9% (Lachema, Brno, ČR), kyselina (-)-chinová (Sigma Chemical, Louis, USA), kyselina fumárová >99,5% (Fluka Chemie, Buchs, SRN), kyselina

lina L(+)-askorbová, Eur. pharm. (Janssen Chimika, Geel, Belgicko), kyselina DL-izocitrónová, trisodná soľ 97% (Aldrich Chemie, Steinheim, SRN).

#### *Chemikálie*

Kyselina *o*-fosforečná, min. 85% (Lachema, Brno, ČR).

#### *Vzorky*

100% citrusové šťavy a nektáre, ako aj šťavy s jednou a viacerými ovocnými zložkami v tetrapakovom balení, sa získali v slovenskej obchodnej sieti. Šťavy pochádzali od rôznych výrobcov. Pred analýzou sa prefiltrovali cez papierový filter, 100% šťavy sa zriedili 20-násobne a nektáre 10- až 5-násobne s destilovanou vodou. Manuálne vylisované citrusové šťavy sa získali z čerstvého ovocia, ktoré sa zakúpilo na trhu a pred analýzou sa upravilo takisto ako 100% šťavy. Podobne sa analyzovali aj vzorky štiav označené ako „vývojové“, ktoré externe pripravil a dodal tuzemský výrobca.

#### *Štatistika*

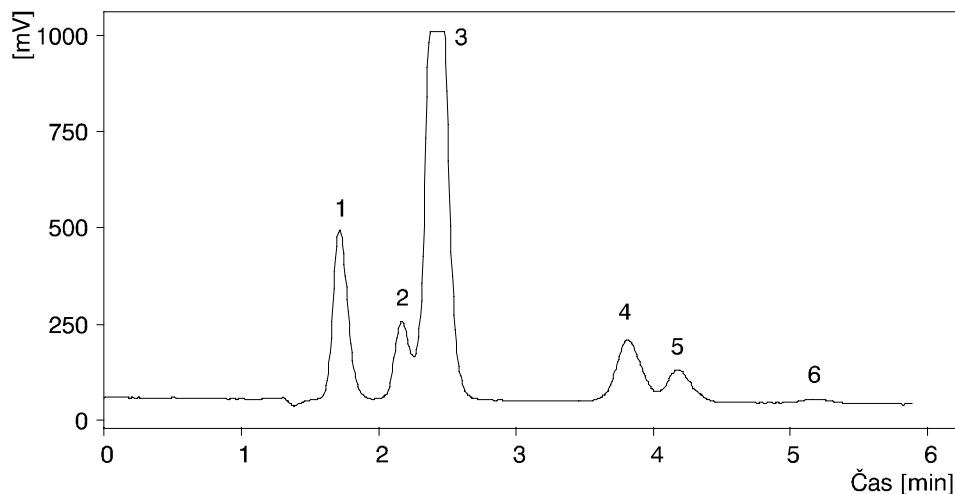
Údaje z analýz sa spracovali chromatografickou datastanicou CSW operujúcou v systéme Windows (DataApex, Praha, ČR) a štatistickým programom ADSTAT, verzia 1.25 (TriloByte™, Pardubice, ČR).

## **Výsledky a diskusia**

Organické kyseliny vínna, L-jablčná, citrónová, jantárová, chinová, fumárová, askorbová a D-izocitrónová sa vybrali na základe ich prirodzeného výskytu v ovocných šťavách. Kyselina citrónová a L-jablčná sú dominantnými kyselinami ovocných štiav a vyskytujú sa v nich vo vysokých koncentráciách ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), naopak kyselina D-izocitrónová sa nachádza v nízkych koncentráciách najmä v citrusových šťavách ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Prítomnosť ostatných organických kyselín závisí od druhu ovocnej šťavy. Chromatogram na obr. 1 znázorňuje charakteristický profil separovaných organických kyselín v štandardnej zmesi. Trvanie analýzy bolo maximálne 6 minút. Identifikácia jednotlivých kyselín je založená na retenčnom čase a výpočet koncentrácie kyselín sa vykonal metódou externého štandardu pomocou kalibračnej čiary (chromatografická datastanica CSW).

#### *Selektivita*

Ako ukazuje obr. 1, kyselina vínna a chinová sa eluovali v popísanom chromatografickom systéme v jednom píku (retenčný čas samostatných štan-



OBR. 1. Organické kyseliny v štandardnom roztoku.

1 - kyselina vínna + kyselina chinová, 2 - kyselina L-jablčná + kyselina D-izocitrónová, 3 - kyselina L-askorbová, 4 - kyselina citrónová, 5 - kyselina jantárová, 6 - kyselina fumárová.

FIG. 1. Organic acids in standard solution.

1 - tartaric acid + quinic acid, 2 - L-malic acid + D-isocitric acid, 3 - L-ascorbic acid, 4 - citric acid, 5 - succinic acid, 6 - fumaric acid.

dardov kyselín bol 1,76 min pre kyselinu vínnu a 1,79 min pre kyselinu chinovú). Podobne neodseparované a eluované v jednom píku boli aj kyselina L-jablčná a D-izocitrónová (retenčný čas samostatných štandardov kyselín bol identický - 2,17 min). Tento fakt umožňuje stanoviť len sumárnu koncentráciu predmetných kyselín v tých ovocných šťavách, v ktorých sa vyskytujú spoločne. Z tohto dôvodu je uvedená metóda selektívna len pre kvantitatívne stanovenie kyseliny L-askorbovej, citrónovej, jantárovej a fumárovej vo všetkých druhoch ovocných štiav.

### Kalibrácia

Kalibračné analýzy štandardných roztokov organických kyselín sa vykonali pri minimálne šiestich koncentračných hladinách a vyhodnotili sa chromatografickým programom CSW (tab. 1). Tab. 1 obsahuje základné validačné parametre pre kyselinu L-askorbovú, citrónovú, jantárovú a fumárovú. Korelačné koeficienty sa pohybovali v rozsahu 0,990 až 0,999 a potvrdzujú dobrú linearitu.

TAB. 1. Validačné parametre.  
TAB. 1. Validation parameters.

Druh organickej kyseliny <sup>1</sup>	LOD [mg.dm <sup>-3</sup> ]	LOQ [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Lineárny rozsah <sup>2</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Korelačný koeficient <sup>3</sup>	Opakovateľnosť <sup>4</sup> RSD [%]	Neistota <sup>5</sup> 2U <sub>C</sub> [%]
L-askorbová <sup>6</sup>	0,80	2	2–50	0,996864	0,32	2,44
citrónová <sup>7</sup>	20	50	50–1000	0,990577	0,10	5,78
jantárová <sup>8</sup>	10	50	50–1000	0,999999	0,07	5,80
fumárová <sup>9</sup>	0,025	0,040	0,03–5,00	0,999888	0,10	4,40

LOD - limit detekcie, LOQ - limit kvantifikácie, RSD - relatívna štandardná odchýlka pre n = 3–6.

Neistota 2U<sub>C</sub> sa vypočítala ako  $2\sqrt{U_A^2 + U_B^2}$ , kde U<sub>A</sub> je neistota typu A a U<sub>B</sub> je neistota typu B.

LOD - limit of detection, LOQ - limit of quantification, RSD - relative standard deviation for n = 3–6.

The uncertainty 2U<sub>C</sub> was calculated as  $2\sqrt{U_A^2 + U_B^2}$ , where U<sub>A</sub> is uncertainty of type A and U<sub>B</sub> is uncertainty of type B.

1 - sort of fruit acid, 2 - linearity range, 3 - correlation factor, 4 - repeatability, 5 - uncertainty, 6 - L-ascorbic acid, 7 - citric acid, 8 - succinic acid, 9 - fumaric acid.

### Limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ)

Limit detekcie sa stanovil tak, že sa ovocná šťava zriedila do takej miery destilovanou vodou, že koncentrácia kyselín bola na úrovni detegovateľnosti (slepá vzorka). Zo získaných signálov detektora (v mVs) sa vypočítala priemerná hodnota signálu a jeho smerodajná odchýlka podľa vzťahu [16]

$$Y(D) = X_0 + 3 s_x$$

kde Y(D) je signál detektora v mVs, X<sub>0</sub> je priemerný signál slepej vzorky v mVs a s<sub>x</sub> je smerodajná odchýlka signálu slepej vzorky.

Koncentrácia pre LOD v mg.l<sup>-1</sup>, resp. g.l<sup>-1</sup> jednotlivých kyselín sa vypočíta z kalibračnej čiary.

Podobne sa stanovil limit kvantifikácie podľa vzťahu [16]

$$Y(Q) = X_0 + 10 s_x$$

### Opakovateľnosť

V období štyroch mesiacov (jún až september) sa opakovane analyzovali štandardné roztoky kyseliny citrónovej a jantárovej (koncentrácia 0,5 g.dm<sup>-3</sup>), kyseliny L-askorbovej (koncentrácia 41 mg.dm<sup>-3</sup>) a kyseliny fumárovej (koncentrácia 5,1 mg. dm<sup>-3</sup>), ktoré sa skladovali v chladničke pri 4 °C. Počas tohto obdobia sa na analýzy použili nové šarže mobilnej fázy a analýzu ovplyvňovala aj teplota, ktorá kolísala podľa ročného obdobia. Údaje z týchto analýz

sa spracovali ako relatívna smerodajná odchýlka internej reprodukovateľnosti (RSD), ktorá sa pohybovala v rozsahu 0,07 až 0,32 %. Nízke hodnoty RSD poukazujú na vysokú precíznosť výsledkov analýz.

### Výťažnosť

Presnosť metódy sa overila na výťažnosti kyseliny L-askorbovej, citrónovej a jantárovej zo 100% pomarančovej, grapefruitovej a jablčnej šťavy. Výťažnosť kyselín pri fortifikačnej hladine 1,1 g.dm<sup>-3</sup> pre kyselinu L-askorbovú a 3,4 g.dm<sup>-3</sup> pre kyselinu citrónovú a jantárovú sa vypočítala podľa vzťahu:

$$\text{Výťažnosť [\%]} = \frac{(\text{koncentrácia fortifikovanej vzorky} - \text{koncentrácia pôvodnej vzorky})}{\text{koncentrácia prídavku}} \times 100$$

Výťažnosť sledovaných kyselín sa pohybovala v rozpätí 79 až 103 % (tab. 2).

TAB. 2. Výťažnosť kyselín zo 100% ovocných štiav.  
TAB. 2. Recovery rate of acids from 100% fruit juices.

Druh 100% šťavy <sup>1</sup>	Pôvodná koncentrácia <sup>2</sup>	Koncentrácia po prídavku <sup>3</sup>	Teoretická koncentrácia <sup>4</sup>	Stanovená koncentrácia <sup>5</sup>	Výťažnosť <sup>6</sup> [%]
Kyselina L-askorbová <sup>7</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]					
pomarančová <sup>8</sup>	69,2	1124,6	1193,8	962,8	79,4
grapefruitová <sup>9</sup>	84,5	1124,6	1209,1	984,9	80,1
jablčná <sup>10</sup>	35,2	1124,6	1159,8	960,9	82,3
Kyselina citrónová <sup>11</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]					
pomarančová	5,4	3,4	8,8	8,1	79,4
grapefruitová	7,6	3,4	11,0	10,5	85,3
jablčná	0,9	3,4	4,3	4,1	94,1
Kyselina jantárová <sup>12</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]					
pomarančová	0,4	3,4	3,8	3,8	100,0
grapefruitová	0,2	3,4	3,6	3,7	102,9
jablčná	0,4	3,4	3,8	3,7	97,1

Teoretická koncentrácia sa vypočítala ako:

$$\frac{(\text{koncentrácia fortifikovanej vzorky} - \text{koncentrácia prídavku})}{\text{koncentrácia prídavku}} \times 100$$

Theoretical concentration was calculated as:

$$\frac{(\text{concentration of fortified sample} - \text{concentration of addition})}{\text{concentration of addition}} \times 100$$

1 - sort of 100% fruit juice, 2 - primary concentration (before fortification), 3 - concentration after addition (fortification), 4 - theoretical concentration, 5 - determined concentration, 6 - recovery rate, 7 - L-ascorbic acid, 8 - orange, 9 - grapefruit, 10 - apple, 11 - citric acid, 12 - fumaric acid.

TAB. 3. Obsah organických kyselín v ovocných šťavách.

TAB. 3. Content of organic acids in fruit juices.

Druh ovocnej šľavy <sup>1</sup>	Kyselina L-askorbová <sup>2</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina fumárová <sup>3</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina citrónová <sup>4</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina jantárová <sup>5</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]
100% pomarančová <sup>6</sup> A	57,6 RSD 1,90	ND	8,5 RSD 2,99	ND
100% pomarančová B	103,7 RSD 0,88	ND	8,1 RSD 0,69	0,5 RSD 0,37
100% pomarančová C	70,7 RSD 3,92	ND	12,3 RSD 3,67	0,6 RSD 1,90
100% pomarančová D	86,9 RSD 5,39	ND	11,8 RSD 2,16	ND
100% pomarančová, vývojová vzorka <sup>7</sup>	1331,0 RSD 2,39	ND	9,0 RSD 8,29	ND
referenčná hodnota RSK pre pomarančovú šťavu <sup>8</sup>	min. 200	–	7,6–11,5	–
100% grapefruitová žltá, lisovaná <sup>9</sup>	626,0 RSD 0,60	ND	15,0 RSD 0,28	ND
100% grapefruitová ružová <sup>10</sup>	127,0 RSD 5,82	ND	11,4 RSD 0,99	ND
100% grapefruitová, vývojová vzorka <sup>11</sup>	987,1 RSD 7,01	ND	13,9 RSD 2,58	ND
referenčná hodnota RSK pre grapefruitovú šťavu <sup>12</sup>	min. 200	–	9,5–20,0	–
100% citrónová E, vývojová vzorka <sup>13</sup>	1195,4 RSD 1,71	ND	48,6 RSD 11,77	ND
100% citrónová F, vývojová vzorka	837,0 RSD 2,11	ND	42,7 RSD 10,16	ND
referenčná hodnota RSK pre citrónovú šťavu <sup>14</sup>	min. 200	–	max. 60	–
100% jablčná <sup>15</sup>	52,7 RSD 1,24	1,4 RSD 2,59	1,3 RSD 2,12	0,6 RSD 0,52
referenčná hodnota RSK pre jablčnú šťavu <sup>16</sup>	min. 200	–	0,05–0,20	–
100% mandarínková, vývojová vzorka <sup>17</sup>	309,3 RSD 3,59	ND	7,0 RSD 8,71	ND
50% pomarančová	82,6 RSD 2,54	ND	7,4 RSD 1,43	ND
12,5% pomarančová	430,5 RSD 1,43	ND	3,3 RSD 3,88	ND
60% grapefruitová žltá	185,6 RSD 0,93	ND	8,9 RSD 3,33	ND

TAB. 3. pokračovanie/continued

Druh ovocnej šťavy <sup>1</sup>	Kyselina L-askorbová <sup>2</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina fumárová <sup>3</sup> [mg.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina citrónová <sup>4</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]	Kyselina jantárová <sup>5</sup> [g.dm <sup>-3</sup> ]
20% jablčná	65,2 RSD 2,27	0,5 RSD 0,05	1,6 RSD 1,35	ND
25% hroznová <sup>18</sup>	85,6 RSD 3,94	0,4 RSD 13,32	1,4 RSD 2,92	ND
25% jablčnôhrušková <sup>19</sup>	204,9 RSD 1,19	0,3 RSD 1,75	2,1 RSD 1,39	ND
25% čiernoríbezľová <sup>20</sup>	394,0 RSD 1,13	ND	10,6 RSD 3,28	ND
100% mrkvovo-jablčno- pomarančová <sup>21</sup>	1417,0 RSD 2,09	0,5 RSD 1,36	3,8 RSD 0,75	1,0 RSD 5,51

RSD - relatívna štandardná odchýlka v percentách pre n = 2, ND - nedetegované.

RSD - relative standard deviation in percent for n = 2, ND - not detected. 1 - sort of juice, 2 - L-ascorbic acid, 3 - fumaric acid, 4 - citric acid, 5 - succinic acid, 6 - orange, 7 - orange, model sample, 8 - RSK reference value for orange juice, 9 - yellow grapefruit, pressed, 10 - pink grapefruit, 11 - grapefruit, model sample, 12 - RSK reference value for grapefruit juice, 13 - lemon, model sample, 14 - RSK reference value for lemon juice, 15 - apple, 16 - RSK reference value for apple juice, 17 - tangerine, model sample, 18 - grape, 19 - apple-pear, 20 - blackcurrent, 21 - carrot-apple-orange.

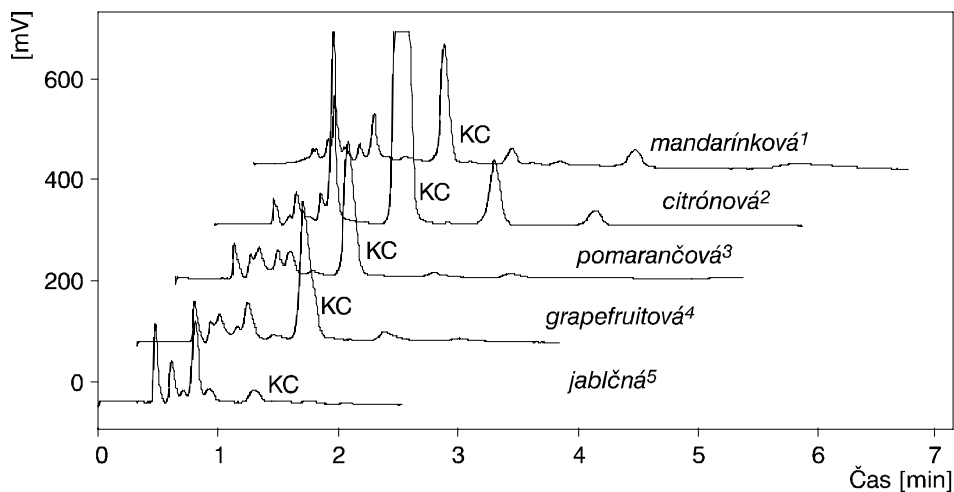
Presnosť metódy pre kyselinu L-askorbovú a fumárovú v multiovocnej šťave sa potvrdila aj v medzinárodnom teste, v ktorom uvádzaná metóda vykázala dobrú koreláciu s ostatnými použitými metódami (HPLC metódy IFU 17 a IFU 72, ktoré sa aplikujú v rámci Medzinárodného združenia producentov ovocných štiav pri kontrole pravosti ovocných štiav).

#### Neistota merania

Neistota merania sa stanovila ako kombinovaná neistota s parametrom pokrytia 2 (2U<sub>C</sub>) a s hladinou spoľahlivosti 95 %. Pri odhade neistoty sa stanovili ako čiastkové zdroje neistôt váženie hmotnosti štandardov, rozpustenie štandardov v presnom objeme, riedenie vzorky a linearita kalibračnej čiary.

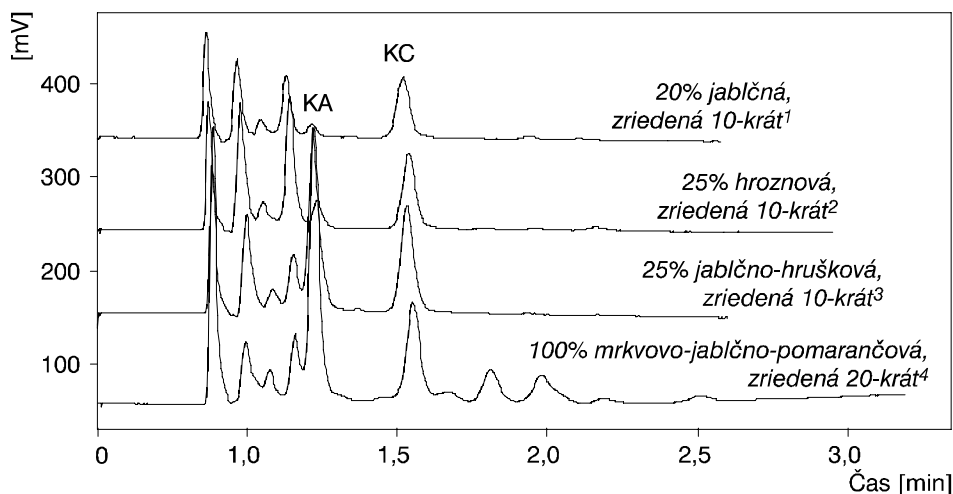
Obsah organických kyselín v analyzovaných šťavách (100% šťavy, jednozložkové a zmesné nektáre) sumarizuje tab. 3, ktorá obsahuje aj porovnávacie referenčné hodnoty RSK pre 100% šťavy. Typické chromatografické profily kyselín v 100% šťavách sú na obr. 2. Obr. 3 znázorňuje profily kyselín v zmesných šťavách a nektároch. Výrazným markerom týchto štiav je kyseli-





OBR. 2. Chromatografické profile organických kyselín v 100% šťavách.  
Šťavy sa filtrovali a zriedili 20-krát. KC - kyselina citrónová.

FIG. 2. Chromatographic profiles of organic acids in 100% juices.  
Juices were filtrated and diluted 20-times. KC - citric acid. 1 - tangerine, 2 - lemon, 3 - orange, 4 - grapefruit, 5 - apple.



OBR. 3. Chromatografické profile organických kyselín v zmesných šťavách a nektároch.  
KA - kyselina L-askorbová, KC - kyselina citrónová.

FIG. 3. Chromatographic profiles of organic acids in mixed juices and nectars.  
KA - L-ascorbic acid, KC - citric acid. 1 - 20% apple, diluted ten times, 2 - 25% grape, diluted ten times, 3 - 25% apple-pear, diluted ten times, 4 - 100% carrot-apple-orange, diluted twenty times.

na citrónová. Stanovený obsah kyseliny L-askorbovej bol najnižší v 100% jablčnej šťave a v jablčných a hroznových nektároch. V jablčných nektároch sa stanovili aj nízke koncentrácie kyseliny fumárovej, ktoré však nepresiahli limitnú koncentráciu  $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Kyselina jantárová sa detegovala v niektorých 100% pomarančových šťavách v koncentrácii okolo  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Referenčným hodnotám RSK v obsahu kyseliny L-askorbovej nevyhovela 100% jablčná šlava a niektoré druhy 100% pomarančových štiav, ktoré nedosiahli ani minimálnu hranicu koncentrácie  $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### Záver

Metodika HPLC je vo všeobecnosti vhodným nástrojom na zistenie profilu organických kyselín v citrusových šťavách ako markerov pravosti a kvality štiav. Predložený príspevok popisuje metódu HPLC stanovenia kyseliny L-askorbovej, citrónovej, jantárovej a fumárovej v citrusových a iných druhoch štiav. Metóda vykazuje dobré validačné parametre. Pri optimalizácii metódy sa okrem uvedených kyselín sledovali aj kyselina D-izocitrónová, L-jablčná, vínna a chinová, ktoré sa takisto vyskytujú v citrusových a iných šťavách. Tieto kyseliny však nebolo možné v danom chromatografickom systéme kvantitatívne stanoviť pre ich vzájomnú interferenciu. Citrusové šťavy analyzované predloženou metódou okrem niektorých výchyliet v obsahu kyseliny L-askorbovej korelovali s referenčnými hodnotami RSK, ktoré sú záväznými kvalitatívnymi kritériami pre zloženie 100% ovocných štiav v Nemecku. Prezentovaná metóda HPLC je vhodná na rutinnú analýzu a na účely kvalitatívnej kontroly predmetných kyselín v citrusových a iných šťavách.

#### *Zoznam skratiek (Abbreviation list)*

- RSK - smerové hodnoty a rozsahy charakteristických hodnôt pre jablčné, hroznové a pomarančové šťavy (Richtwerte und Schwangungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Apfelsaft, Traubensaft und Orangensaft).
- IFU - Medzinárodné združenie výrobcov ovocných štiav (The International Federation of Fruit Juice Producers)
- AUFS - hodnota výstupného rozsahu citlivosti UV detektora (Absorbance Unit Full Scale)

## Literatúra

1. Council Directive 93/77/EEC of 21 September 1993 relating to fruit juices and similar products. Official Journal of the European Communities, 1993, No. L 244, s. 1-9.
2. 81. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 10. augusta 2000 č. 2313/4/2000-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca nápoje. Tretia časť. Osobitné požiadavky. Dvadsať piata hlava. Nápoje. Vestník MZ SR, 2000, čiastka 37-40, s. 377-383.
3. DIONEX CORPORATION, Sunnyvale Canada: Better solutions for food and beverage analysis. 1995. 36 s.
4. GHERARDI, S. - SACCANI, G. - TRIFIRO, A. - CALZA, M.: Use of ion chromatography for organic acid determination in fruit juices. In: Report on SGF-Symposium „Progress in the authenticity - assurance for fruit juices“. Parma/Italy, September 06-09, 1994. Zornheim : Schutzgemeinschaft der Fruchtsaft-Industrie, 1994, s. 19-46.
5. SAAVEDRA, L. - RUPÉREZ, F. J. - BARBAS, C.: Capillary electrophoresis for evaluating orange juice authenticity: A study on spanish oranges. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 2001, s. 9-13.
6. CANCALON, P. F.: Routine analysis of ascorbic acid in citrus juice using capillary electrophoresis. Journal of AOAC International, 84, 2001, s. 987-992.
7. CHEN ZHANGUO - LU JIURU: Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid, and succinic acid in Fructus mume by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science, 40, 2002, s. 35-39.
8. CUNHA, S. C. - FERNANDES, J. O. - FERREIRA, I. M. P. L. V. O.: HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. European Food Research and Technology, 214, 2002, s. 67-71.
9. HASIB, A. - JAOUAD, A. - MAHROUZ, M. - KHOULI, M.: HPLC determination of organic acids in Moroccan apricot. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 3, 2002, s. 207-211.
10. KVASNÍČKA, F. - VOLDŘICH, M.: Determination of fumaric acid in apple juice by on-line detection. Journal of Chromatography A, 891, 2000, s. 175-181.
11. JEŽEK, J. - SUHAJ, M.: Application of capillary isotachopheresis for fruit juice authentication. Journal of Chromatography A, 916, 2001, s. 185-189.
12. LACKO, L. - SUHAJ, M. - BELAJOVÁ, E. - KOVÁČ, M.: Fruit juices and nectars quality evaluation by chromatographic and enzymatic methods. In: Tagungsband der Österreichischen Lebensmittelchemikertage „Qualität und Frische von Lebensmitteln“, St. Pölten, 5.-7. Juni 2002. Viedeň : Gesellschaft Österreichischer Chemiker, AG Lebensmittel, Kosmetik und Tenside, 2002, s. 276-282.
13. BEUTLER, H. O. - ARA, V.: Enzymatische Bestimmung von D-Apfelsäure in Fruchtsäften. Flüssiges Obst, 59, 1992, s. 552-554.
14. TING, S. V. - RUSSELL L. R.: Citrus fruits and their products. Analysis and technology. New York, Basel : Marcel Dekker, 1986. 293 s.
15. EISELE, T. A.: Determination of D-malic acid in apple juice by liquid chromatography. Journal of AOAC International, 79, 1996, s. 50-54.
16. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide. Teddington : Eurachem Working Group LGC, 1998. 61 s.

Do redakcie došlo 3.4.2003.

**Determination of organic acids in fruit juices and nectars by the HPLC method**

BELAJOVÁ, E. - SUHAJ, M.: Bull. potrav. Výsk., 42, 2003, p. 95-106.

SUMMARY. A reversed-phase high-performance liquid chromatography for the separation and determination of ascorbic acid (AA), citric acid (CA), succinic acid (SA), and fumaric acid (FA) in fruit juices and nectars is described. The method was validated and used for quality evaluation of selected commercial fruit juices and nectars according to the chromatographic profile of the present organic acids. The detection limits were  $0.80 \text{ mg.dm}^{-3}$  for AA,  $20 \text{ mg.dm}^{-3}$  for CA,  $10 \text{ mg.dm}^{-3}$  for SA, and  $0.025 \text{ mg.dm}^{-3}$  for FA. The relative standard deviation (RSD) of repeatability was less than 0.32 % for  $n = 6$  and the uncertainty of measurement using the covering factor of 2 varied from 2.44 % to 5.80 %. A single chromatographic separation of acids took 6 minutes. Concentrations of the individual acids present in 100 % citrus juices were compared to reference values which represent fruit juices authenticity criteria in Germany.

KEYWORDS: organic acids; fruit juices; fruit nectars; HPLC