

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

METODY STANOVENÍ D-ISOCITRONOVÉ KYSELINY VE VÝROBCÍCH Z OVOCE

TEREZA PODSKALSKÁ, FRANTIŠEK KVASNIČKA
a HELENA ČÍŽKOVÁ

Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
podskalt@vscht.cz

Došlo 14.1.21, přijato 16.8.21.

Klíčová slova: D-isocitronová kyselina, enzymový set, kapilární izotachoforéza, kapilární zónová elektroforéza

Úvod

Isocitronová kyselina (1-hydroxy-1,2,3-propantrikarboxylová) existuje ve formě čtyř stereoizomerů: D-erythro, L-erythro, D-threo a L-threo. Pouze D-threo-isocitronová kyselina (tedy (2R,3S)-ICA) je meziproduktem citrátového cyklu (trikarboxylových kyselin). Nachází se ve většině živých buněk, ve kterých působí proti oxidačnímu stresu jako antioxidant. Bylo zjištěno, že ICA je dokonce aktivnějším antioxidantem než askorbová kyselina. Ostatní stereoizomery nejsou biologicky aktivní a jsou dokonce inhibitory některých enzymatických reakcí v buňkách¹⁻⁴.

ICA se akumuluje v listech a stoncích rostlin a též v plodech, zejména v citrusech (např. limetky 180–600 mg l⁻¹, citróny 230–500 mg l⁻¹) a v bobulovinách (např. černý rybíz 125–500 mg l⁻¹)^{3,5}. Na druhou stranu není přítomna např. v jablkách nebo ve vinných hroznech^{5,6}. Patří společně s dalšími minoritními kyselinami, jako je šikimová kyselina nebo chinová kyselina, mezi charakteristické složky některých druhů ovoce, kde je ale přítomna v koncentracích mnohem nižších než majoritní organické kyseliny (citronová (CA), jablečná (MA) a vinná). V plodech se vyskytuje jako volná kyselina nebo její derivát (ve formě esterů či laktonů)⁵⁻⁸.

Běžně se používá jako marker pro posouzení autenticity a kvality ovocných produktů (nejčastěji citrusových šťáv). Jako ukazatel falšování nepovoleným/nedeklarovaným přikyselením ovocných šťáv lze použít zvýšenou hodnotu poměru CA/ICA, která neodpovídá rozmezí hodnot uvedených v referenční směrnici Code of Practice (CoP)⁵ pro ovocné produkty. Na rozdíl od jiných

organických kyselin se kvůli vysoké pořizovací ceně nepoužívá pro podvodné účely⁵⁻⁹.

Koncentrace organických kyselin, zejména ICA (viz tab. I, II a III), jsou velmi variabilní. Závisí do značné míry na druhu ovoce, stádiu zralosti, klimatických a půdních podmínkách i na technologiích výroby. Organické kyseliny ve výrobcích z ovoce ovlivňují stabilitu, nutriční hodnotu a chuť. Podle CoP se pro autentickou pomerančovou šťávu pohybuje hodnota koncentrace ICA v rozmezí 65–200 mg l⁻¹, pro jahodovou šťávu 30–90 mg l⁻¹ a pro rajčatovou šťávu 65–150 mg l⁻¹ (cit.^{5,6}). Organické kyseliny (jablečná, vinná, citronová, chinová, šikimová a isocitronová) ve výrobcích z ovoce mohou být stanoveny pomocí následujících metod: enzymatické metody, vysokoúčinná kapalinová

Tabulka I

Koncentrace ICA v pomerančových šťávách v dříve publikovaných pracích

Metody	D-isocitronová kyselina	Analyzované vzorky	Lit.
r-Biopharm	34–140 mg kg ⁻¹	5	15
CITP (systém I)	23–40 mg kg ⁻¹		
CITP (systém II)	96–282 mg kg ⁻¹		
r-Biopharm	53–58 mg l ⁻¹	2	9
CITP	58–65 mg l ⁻¹		
HPLC/UV	73–76 mg l ⁻¹		
CE	39–162 mg l ⁻¹	16	18
CITP	79–98 mg l ⁻¹	3	19
CITP	13–110 mg l ⁻¹	13	20
Megazyme	55–59 mg l ⁻¹	4	7
LC/MS/MS	60–98 mg l ⁻¹	13	21
CE	70–75 mg l ⁻¹	2	6
HPLC/UV	108–111 mg l ⁻¹	2	22
CZE	85–196 mg l ⁻¹	6	11

Tabulka II

Koncentrace ICA v jahodových šťávách v dříve publikovaných pracích

Metody	D-isocitronová kyselina	Analyzované vzorky	Lit.
FIA biosensor	4 mg l ⁻¹	1	13
r-Biopharm	40–60 mg l ⁻¹	9	10
Megazyme	47–59 mg kg ⁻¹	3	7

Tabulka III

Koncentrace ICA v rajčatových šťávách v dříve publikovaných pracích

Metody	D-isocitronová kyselina	Analyzované vzorky	Lit.
r-Biopharm	36 mg kg ⁻¹	1	15
CITP (systém I)	28 mg kg ⁻¹		
FIA biosensor	4 mg l ⁻¹	1	13
Megazyme	58 mg l ⁻¹	1	7

chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) nebo HPLC spojená s různými detektory, jako je spektrofotometrický (UV, UV/VIS) či refraktometrický (RID), kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC/MS/MS), plynová chromatografie (GC), kapilární izotachoforéza (CITP) a kapilární elektroforéza (CE)^{6–16,18–22}. Samostatná D-isocitronová kyselina se obvykle stanovuje enzymatickými metodami, které jsou založeny na reakci isocitrátdehydrogenasy (NADP⁺-dependentní, EC 1.1.1.42), kdy se vytvořený NADPH stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm nebo potenciometrickým biosenzorem pro průtokovou injekční analýzu (FIA)^{8,9,13,14}. Množství NADPH (vytvořeného v této reakci, dle příručky enzymového setu^{8,14} a článku¹⁷) stechiometricky odpovídá množství D-isocitronové kyseliny^{8,9,14,17}. Hlavní výhodou těchto metod je vysoká specifická enzymatická analýza vyžaduje speciální set pro stanovení ICA, což ji činí nákladnou a neadekvátní pro simultánní analýzu dalších organických kyselin. Též je poměrně časově a experimentálně náročná^{7,9,14}.

Popsány jsou i jiné metody pro stanovení ICA, např. CITP, HPLC/UV a další (viz tab. I, II a III)^{8–11}. Jsou však často ovlivněny širokou škálou interferencí a většinou lze jimi stanovit jen určitý počet volných organických kyselin. U chromatografických metod je navíc potřeba provést předběžné úpravy vzorků (např. extrakce či derivatizace)¹¹. Ve srovnání s těmito metodikami nabízí CE určité výhody,

jako je krátká doba analýzy, malá spotřeba vzorku a vysoká účinnost separace^{6,9,11}.

Ježek a Suhaj stanovili ICA pomocí enzymového setu (r-Biopharm¹⁴) a CITP (2 elektrolytové systémy) v grapefruitových, rajčatových a zejména pomerančových šťávách. Ze získaných koncentrací zjistili, že standardní CITP (systém I) poskytoval podobné hodnoty jako enzymatické stanovení (viz tab. I a III), oproti systému II, který nadhodnocoval, a že je nutná jeho další studie a optimalizace¹⁵. Rok poté byly v české studii porovnány 3 metody – enzymový set (r-Biopharm¹⁴), nově navržená CITP a HPLC/UV pro stanovení D-isocitronové kyseliny v šťávách z citrusových plodů. Nejlepší korelace byla zjištěna mezi CITP a enzymatickým stanovením (r = 0,96), další korelační koeficienty byly 0,85 pro HPLC – r-Biopharm¹⁴ a 0,75 pro HPLC – CITP (cit.⁹).

Cílem naší práce bylo porovnání a zhodnocení různých analytických metod (komerční enzymové sety, kapilární izotachoforéza, kapilární zónová elektroforéza) pro stanovení D-isocitronové kyseliny ve vybraných produktech z ovoce (pomerančová šťáva, jahodový džem a kečup) a v referenčním materiálu.

Experimentální část

Společně se vzorky byl testován i referenční materiál (RM) – koncentrát ovocného džusu 1, RM CP L FS 4 (2010600) od německé firmy DRRR (Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien, <https://drrr.de/en/reference-materials/food-and-feed/>), který byl 5× naředěn demineralizovanou vodou. Jeho očekávaná koncentrace deklarovaná výrobcem byla 79,20 ± 17,00 mg kg⁻¹ pro ICA; 9,02 ± 0,84 g kg⁻¹ pro CA; 1,92 ± 0,13 g kg⁻¹ pro MA a poměr CA/ICA v rozmezí 102,45–131,45.

Na třech různých maticích (viz tab. IV) pořízených v lokálním obchodě a na RM byly porovnány následující analytické metody pro stanovení celkové ICA:

- enzymové sety od firem Megazyme⁸ (K-ISOC 02/16) a Boehringer Mannheim¹⁴ (r-Biopharm, cat. No 10

Tabulka IV

Seznam vzorků zakoupených v tržní síti s deklarovaným obsahem ovoce analyzovaných v této studii

Matrice	Značka	Označení vzorků	Deklarovaný obsah ovoce v g/100 g výrobku
Pomerančové džusy	K classic	P1	100
	Toma	P2	100
	Relax	P3	100
Jahodové džemy	K classic	J1	50
	Schwartau	J2	50
	Hamé	J3	50
Kečupy	Hamé	K1	140
	Spak	K2	210
	Hochmann	K3	140

414 433 035) s fotometrickou detekcí při 340 nm (SPEKOL 1300, Analytik Jena AG);

- kapilární izotachoforéza s elektroforetickým analyzátozem (EA 100, Villa Labeco spol. s r.o.) s předseparační kapilárou ($90 \times 0,8$ mm) a analytickou kapilárou ($90 \times 0,3$ mm);
- kapilární zónová elektroforeza s elektroforetickým analyzátozem (EA 102, Villa Labeco spol. s r.o.) s analytickou kapilárou ($90 \times 0,3$ mm).

U elektromigračních metod byl k identifikaci a kvantifikaci ICA použit standard DL-isocitronové kyseliny (trisodná sůl, Sigma-Aldrich) a u enzymatických metod byl použit standard D-isocitronové kyseliny (deklarovaná koncentrace ICA $0,3 \text{ mg ml}^{-1}$; ze setu Megazyme⁸). Zároveň byly stanoveny i další organické kyseliny – CA a MA metodou CZE, kdy k jejich identifikaci a kvantifikaci byl použit modelový vzorek.

Enzymatické metody (Megazyme⁸ a r-Biopharm¹⁴) poskytují dle příruček lineární závislost v rozmezí $1,0\text{--}80,0 \text{ } \mu\text{g}$ D-isocitronové kyseliny^{7,8,14}. Tato lineární závislost byla ověřena v rozmezí $7,6\text{--}60,9 \text{ } \mu\text{g}$ ICA (tedy $76,0\text{--}609,0 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ pro kapalné vzorky a $54,3\text{--}761,3 \text{ mg kg}^{-1}$ pro viskózní vzorky). Pro metody kapilární izotachoforézy (CITP I a CITP II) byla linearita ověřena v kalibračním rozmezí $5\text{--}20 \text{ mg l}^{-1}$ ICA. Pro CZE byl lineární rozsah určen kalibračními roztoky v rozmezí $10\text{--}150 \text{ mg l}^{-1}$ ICA.

Enzymatická metoda

Megazyme

Analýza byla provedena s vlastními menšími úpravami podle normy ČSN 1139 Ovocné a zeleninové šťávy: enzymatické stanovení obsahu D-isocitronové kyseliny – NADPH spektrofotometrická metoda¹⁶ a práce¹⁷. Vlastní stanovení (pipetované množství do kyvet) probíhalo dle příručky Megazyme⁸.

Kapalné vzorky (pomerančové džusy, příp. další ovocné šťávy)

Do kádinky (50 ml) bylo napipetováno 10 ml vzorku a bylo upraveno jeho pH na hodnotu 8,1 pomocí $0,25 \text{ M}$ NaOH (s použitím pH metru). Poté bylo přidáno 5 ml 4 M NaOH (alkalická hydrolyza) a promícháno skleněnou tyčinkou. Po 10 min, kdy se nechal vzorek za občasného promíchání stát, bylo pH roztoku vzorku upraveno na hodnotu 6–7 (kontrola pH metrem) pomocí 4 M HCl (upravená část oproti návodu Megazyme místo přídavku 5 ml 4 M HCl (po 10 min) vycházející z postupu článku¹⁷ a dále označováno jako Megazyme*). Následně byl roztok vzorku kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky. Vzorky byly dále analyzovány postupem z článku¹⁷.

Viskózní vzorky (jahodové džemy a kečupy)

Do Erlenmayerovy baňky (500 ml) bylo naváženo $40\text{--}70 \text{ g}$ zhomogenizovaného vzorku, k němu bylo přidáno 250 ml destilované vody, zhomogenizováno a zfiltrováno přes skládaný filtrační papír (80 g m^{-2} , Laboimpo spol. s r.o.). Navážka se odvíjela podle předpokládaného obsahu ICA ve výrobku (např. pro džemy byla navážka okolo 70 g

a u kečupů cca 40 g). Další postup byl proveden obdobným způsobem jako pro kapalné vzorky¹⁷.

Boehringer Mannheim (r-Biopharm)

Kapalné vzorky (pomerančové džusy, příp. další ovocné šťávy)

Stanovení celkové kyseliny ICA bylo provedeno podle příručky Boehringer Mannheim/r-Biopharm (Cat. No. 10 414 433 035)¹⁴. Bentonit ($0,2 \text{ g}$) byl nahrazen aktivním uhlím ($0,7 \text{ g}$) a u viskózních vzorků byla nejdříve provedena extrakce destilovanou vodou (viz níže).

Do kádinky (50 ml) bylo napipetováno 25 ml vzorku a bylo upraveno jeho pH na hodnotu $10\text{--}11$ pomocí 2 M NaOH (s použitím pH metru, alkalická hydrolyza). Následně byl roztok vzorku inkubován po dobu 20 min ve vroucí vodě, pomocí pH papírků bylo kontrolováno jeho pH ($10\text{--}11$) a případně upraveno 2 M NaOH. Po uplynutí této doby byl roztok ochlazen na pokojovou teplotu a bylo upraveno jeho pH na hodnotu $6,9\text{--}7,2$ s použitím 1 M HCl. Následně byl roztok vzorku kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky. Vzorky byly dále analyzovány postupem dle příručky enzymového setu r-Biopharm¹⁴.

Viskózní vzorky (jahodové džemy a kečupy)

Do kádinky (100 ml) bylo naváženo 15 g vzorku. K této navážce bylo přidáno $50\text{--}60 \text{ ml}$ destilované vody a roztok byl kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky. Poté byl roztok inkubován $20\text{--}30 \text{ min}$ ve vodní lázni ($60\text{--}70 \text{ } ^\circ\text{C}$). Po vychladnutí na pokojovou teplotu byla odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou, promíchána a přefiltrována přes skládaný filtr. Dále bylo postupováno jako u kapalných vzorků (dle příručky)¹⁴.

Kapilární izotachoforéza (CITP)

Jako aniont byla stanovena D-isocitronová kyselina za těchto podmínek:

CITP I (cit.⁹)

vedoucí elektrolyt (LE): 6 mM HCl + $3,8 \text{ mM}$ BisTrisPropan (BTP) + 2 mM CaCl₂ + $0,05\%$ methylhydroxyethylcelulosa (MHEC)

koncový elektrolyt (TE): 5 mM 2-(N-morfolino)ethan-sulfonová kyselina + 1 mM BTP

hnací proud: předseparační kapilára – $250 \text{ } \mu\text{A}$, analytická kapilára – $50 \text{ } \mu\text{A}$, během detekce snížen na $25 \text{ } \mu\text{A}$
modelový vzorek: $0,75 \text{ g l}^{-1}$ CA + $0,13 \text{ g l}^{-1}$ MA + 10 mg l^{-1} ICA

vzorek: vzorky a RM ředěny $25\times$ demineralizovanou vodou
nástřik: proveden pomocí $10 \mu\text{l}$ stříkačky (Hamilton)
detekce: vodivostní

CITP II (cit.¹⁵)

LE₁: 10 mM His-HCl + L-His + $0,2\%$ MHEC, pH 6

LE₂: 6 mM His-HCl + 6 mM L-His + 2 mM CaCl₂ + $0,1\%$ MHEC, pH 6

TE: 10 mM citronová kyselina (CA)

hnací proud: předseparační kapilára – $225 \text{ } \mu\text{A}$, analytická kapilára – $30 \text{ } \mu\text{A}$

modelový vzorek: 0,75 g l⁻¹ CA + 0,13 g l⁻¹ MA + 10 mg l⁻¹ ICA

vzorek: vzorky ředěny demineralizovanou vodou (P a RM 10×; J a K 20×)

nástřik: dávkovacím kohoutem s fixním objemem 30 µl
detekce: vodivostní

Příprava vzorků pro analýzu CITP I i II zahrnuje i vhodné ředění a filtraci přes skládaný papírový filtr. Takto připravený vzorek byl přímo dávkován do analyzátoru EA 100.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

V této studii byla vyvinuta (a odzkoušena) metoda CZE pro rychlé stanovení majoritních organických kyselin (CA a MA) a především minoritní kyseliny ICA.

BGE: 100mM jantarová kyselina + 50mM glycin + 0,05% MHEC + 50% MeOH

hnací proud: analytická kapilára – 75 µA

modelový vzorek: 2 g l⁻¹ CA + 0,6 g l⁻¹ MA + 20 mg l⁻¹ ICA

vzorek: vzorky ředěny demineralizovanou vodou (P1 – P3, RM 5×; J1 – J3, K1 – K3 2×)

nástřik: dávkovacím kohoutem s fixním objemem 200 nl
detekce: vodivostní

Příprava vzorků pro analýzu CZE zahrnuje vhodné ředění a filtraci prostřednictvím skládaného papírového filtru. Takto připravený vzorek byl přímo aplikován do analyzátoru EA 102.

Výsledky a diskuse

Výsledné hodnoty celkové D-isocitronové kyseliny jsou pro každou metodu uvedeny v tab. V, kde ICA je vyjádřena pro všechny vzorky v hodnotách mg kg⁻¹. Ob-

sah ICA je mezi jednotlivými ovocnými druhy (zvláště vzorky J) velmi proměnlivý. Potvrzuje se tím předpoklad o přirozené variabilitě mezi odrůdami a/nebo o odlišnosti výsledků poskytovaných různými analytickými metodami (viz tab. I, II a III). Vliv na obsah ICA může mít technologický postup zpracování, zralost či další parametry.

Pro referenční materiál (RM) by se měla změřená hodnota ICA pohybovat v rozmezí 62,2–96,2 mg kg⁻¹. Tuto podmínku nesplňovaly oba elektrolytové systémy kapilární izotachofórey, proto byla vyvinuta a na RM a dalších vzorcích odzkoušena nová metoda CZE.

U enzymatického stanovení podle setu od firmy Megazyme je důležitým krokem úprava pH na hodnotu 6–7 pomocí 4M HCl a pH metru (upravená část = Megazyme*, místo přídavku 5 ml 4M HCl podle cit.¹⁷) před přidáním pufru. Tím docílíme vhodných podmínek pro proběhnutí enzymatické reakce. Nedodržení pH před přidáním pufru má velký vliv na výslednou hodnotu celkové ICA, kdy poskytuje nižší nálezy a obvykle koncentrace nevyhovuje CoP. Lze tak nepravdivě tvrdit, že některé vzorky jsou falšované. Proto byl na vzorcích vyzkoušen upravený postup (Megazyme*). V tab. V je uveden názorný příklad získaných výsledků podle převzatého pracovního návodu článku¹⁷ a upraveného postupu (Megazyme*). Velkou výhodou enzymových setů (Megazyme a r-Biopharm) oproti elektromigračním metodám je možnost stanovení celkové či jen volné D-isocitronové kyseliny. Pokud chceme dosáhnout dostatečně přesných výsledků, vzrůst absorbance ΔA by zpravidla měl být alespoň 0,1 (cit.^{8,14}). U vzorků s nižší koncentrací D-isocitronové kyseliny (v našem případě J1 a J3) nebyla tato zásada dodržena, přestože byla zvýšena navážka vzorku. I přesto byla metoda Megazyme* (cit.⁸) vyhodnocena jako nejlepší metoda pro stanovení ICA. Jako jediná si nejlépe poradila se stanovením ICA v kečucech, kdy obsah chloridů neměl na

Tabulka V

Výsledky elektromigračních metod a enzymatického stanovení ICA ve vybraných matricích a referenčním materiálu, koncentrace CA, MA a poměr CA/ICA metodou CITP I a CZE

	D-isocitronová kyselina (ICA) [mg kg ⁻¹]						CA [g kg ⁻¹]		MA [g kg ⁻¹]		Poměr CA/ICA	
	Mega zyme	Mega zyme*	r-Bio pharm	CITP I	CITP II	CZE	CITP I	CZE	CITP I	CZE	CITP I	CZE
P1	46 ± 1	75 ± 0	86 ± 1	89 ± 1	38 ± 3	85 ± 2	6 ± 0	8 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	70	92
P2	53 ± 0	102 ± 1	105 ± 1	99 ± 0	37 ± 1	105 ± 0	8 ± 0	9 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	80	85
P3	33 ± 1	67 ± 1	65 ± 1	75 ± 1	37 ± 1	73 ± 1	6 ± 0	7 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	76	92
J1	23 ± 2	29 ± 2	43 ± 9	–	19 ± 1	34 ± 0	–	16 ± 0	–	2 ± 0	–	465
J2	62 ± 6	95 ± 1	151 ± 6	–	62 ± 3	107 ± 5	–	15 ± 0	–	1 ± 0	–	121
J3	28 ± 2	34 ± 1	82 ± 4	–	21 ± 0	35 ± 0	–	16 ± 0	–	3 ± 0	–	450
K1	65 ± 1	87 ± 1	110 ± 0	–	71 ± 1	42 ± 0	–	–	–	–	–	–
K2	110 ± 1	126 ± 0	154 ± 4	–	148 ± 8	48 ± 0	–	–	–	–	–	–
K3	48 ± 0	75 ± 0	96 ± 2	–	94 ± 6	70 ± 2	–	–	–	–	–	–
RM	67 ± 1	87 ± 0	78 ± 1	105 ± 2	28 ± 0	86 ± 1	10 ± 0	10 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	96	116

* úprava na hodnotu pH 6–7 (kontrolováno pH metrem)

Tabulka VI

Porovnání enzymatických a elektromigračních metod; charakteristika uvedena pro jednotlivé matrice – pomerančové džusy (P), jahodové džemy (J), kečupy (K) a referenční materiál (RM)

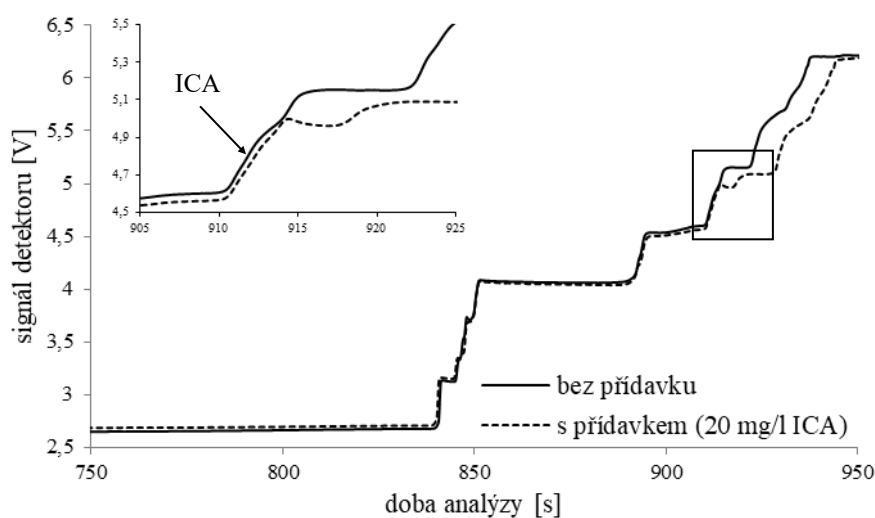
Metody	Enzymové sety				Elektromigrační metody				
Parametry	Megazyme/ Megazyme*		r-Biopharm		CITP I	CITP II		CZE	
Stanovení	volná a celková ICA				celková ICA + příp. další org. kyseliny (např. CA a MA; za specifických podmínek)				
Přibližná cena analýzy (1 vzorek)	60 Kč		85 Kč		5 Kč				
	vysoká pořizovací cena setů, není započítána pořizovací cena spektrofotometru				není započítána pořizovací cena přístroje				
Přibližná navážka/ pipetované množství vzorku	P + RM	J + K	P + RM	J + K	P + RM + J + K	P + RM	J + K	P + RM	J + K
	10 ml	40–70 g	25 ml	15 g	4 g	5 g	2,5 g	2 g	5 g
Přibližná doba stanovení (1 vzorek, příprava vzorku + vlastní stanovení)	1 h + 10 min		1 h + 20 min		5 min + 17 min	5 min + 27 min		5 min + 15–18 min	
Experimentální náročnost	příprava vzorku (ředění, filtrace, hydrolýza)		příprava vzorku (ředění, filtrace, hydrolýza)		nutnost optimalizace separačních podmínek (především pro matrici jahodový džem a kečup)				
LOD [mg kg ⁻¹]	7,1	3,5	18,6	4,7	2,3	0,7		3,3	
LOQ [mg kg ⁻¹]	23,6	11,7	61,9	15,7	7,7	2,3		11,0	
Opakovatelnost [%] (P1, n = 5)	0,3		1,4		0,7	8,0		2,4	
Výtěžnost [%] (50% přídavek)	P3	113	112		79	75		110	
	J3	101	62		–	86		100	
	K3	110	77		–	103		96	

analýzu vliv jako v případě elektromigračních metod. Oproti metodě r-Biopharm¹⁴ je analýza o několik minut rychlejší a v přepočtu na pořizovací cenu setu i levnější variantou (viz tab. VI).

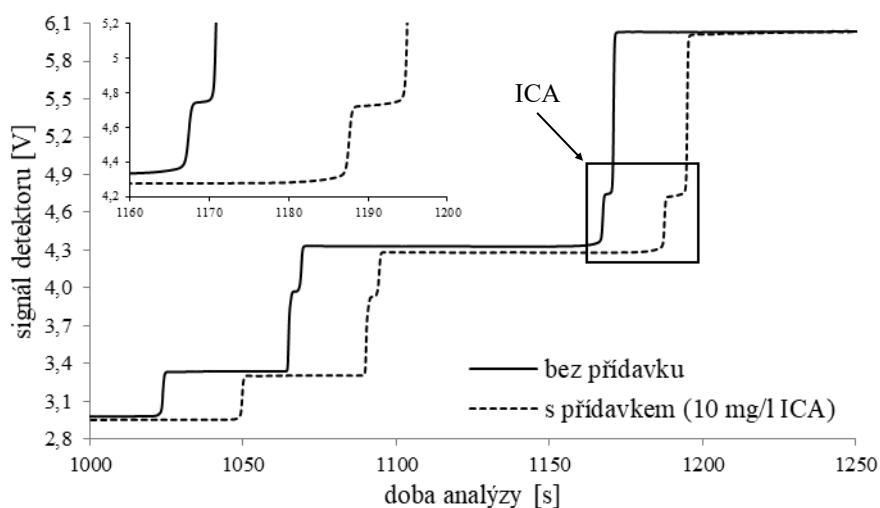
Pro stanovení D-isocitronové kyseliny kapilární izotachoforézou (CITP) byly převzaty elektroforetické podmínky bez větších úprav^{9,15}. Metody CITP byly navrženy pro analýzu převážně citrusových šťáv^{9,15}. Proto vzhledem k vysokému obsahu soli (chloridů) ve vzorcích kečupů K1 – K3 bylo nutné s ohledem na separační kapacitu elektrolytového systému použít větší ředění vzorků, a tím se dostat pod (u CITP I) nebo téměř na limit detekce metody (u CITP II). U vzorků džemů (J1 – J3) je koncentrace ICA nižší než u citrusových šťáv, tedy po nutném minimálním naředění vzorku se též dostáváme blízko LOD jako v případě kečupů. Důsledkem toho je větší chyba stanovení. Vybrané izotachoforeogramy jsou zobrazeny na obr. 1 a 2 (vlá ICA je v záznamech vyznačena). Při použití CITP I před D-isocitronovou kyselinou migruje jablečná kyselina, citronová kyselina migruje za ICA (vyhodnoceno ze záznamu detektoru předseparační kapiláry). V případě použití CITP II kyseliny migrují v pořadí jablečná (MA), D-isocitronová (ICA) a nakonec citronová (CA) jako kon-

cový elektrolyt. Porovnání metod bylo provedeno na základě korelačního koeficientu. Nejlepší korelace ($r = 0,812$) byla mezi enzymatickými metodami Megazyme* – r-Biopharm. Pro ostatní metody byl korelační koeficient nižší než jeho kritická hodnota ($r_{krit} = 0,7646$ pro $n = 10$, $\alpha = 0,01$). Pokud vyloučíme výsledky pro vzorky K1 – K3 z důvodu vysokého obsahu soli (viz výše), je velmi silná korelace mezi metodami Megazyme* (cit.⁸) a CZE ($r = 0,988$).

Velkou předností elektromigračních metod (CITP i CZE) oproti enzymovým setům je možnost stanovení i L-isocitronové kyseliny (spolu s ICA)⁶, nízká spotřeba zejména viskózních vzorků, a především stanovení dalších organických kyselin (např. CA a MA) zároveň v jedné analýze (viz tab. VI). Proto jsou v tab. V rovněž uvedeny výsledné hodnoty citronové kyseliny (CA) a jablečné kyseliny (MA) v analyzovaných vzorcích (pomerančových džusů a jahodových džemů) a v referenčním materiálu (RM) stanovené pomocí metod CITP I a CZE. Pro tyto metody byl spočten u zmíněných vzorků a u RM poměr CA/ICA, kdy jeho zvýšená hodnota (oproti CoP) značí přidání syntetické citronové kyseliny. O tom se můžeme přesvědčit u jahodových džemů, kdy její přídavek byl ve složení deklarován. Všechny analyzované vzorky 100%



Obr. 1. Izotachforeogram vzorku P1 – metoda CITP I (záznam z analytické kapiláry)



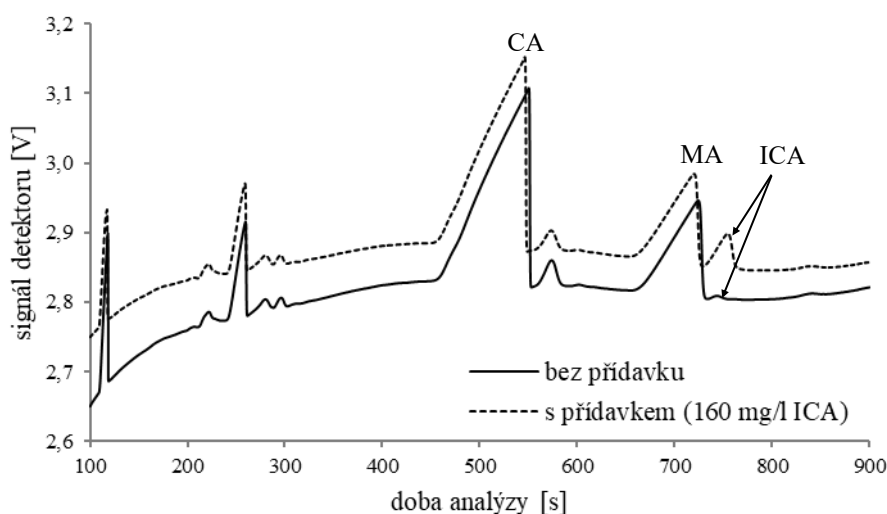
Obr. 2. Izotachforeogram vzorku P1 – metoda CITP II (záznam z analytické kapiláry)

pomerančových džusů splňují podmínku udávanou CoP (poměr CA/ICA max. 130)⁵. Pro analýzu referenčního materiálu se ukázala vhodnější metoda CZE než CITP I, jelikož hodnota nalezená pomocí CZE byla v rozmezí vycházejícího z deklarovaných koncentrací citronové kyseliny (CA) a D-isocitronové kyseliny (ICA).

Vzhledem k tomu, že u CITP I byla pro jahodové džemy nalezena vysoká koncentrace ICA (neodpovídala hodnotám CoP) a u kečupů byla blízko limitu detekce, nebyly u nich stanoveny další organické kyseliny (CA a MA). Pro CZE nejsou uvedeny výsledné hodnoty citronové a jablečné kyseliny u vzorků kečupů, jelikož došlo

díky vysokému obsahu chloridů k překročení separační kapacity systému. Navíc v retenčním čase MA byla eluována další kyselina. Mohlo se jednat např. o pyroglutamovou kyselinu. Metodou CITP II nebyly tyto kyseliny (CA a MA) kvantifikovány, neboť CA je zde koncovým elektrolytem. Záznam vzorku P1 metodou CZE je uveden na obr. 3. Nejdříve migruje CA, poté MA a nakonec D-isocitronová kyselina (ICA).

Limit kvantifikace (LOQ) byl vypočítán podle definice IUPAC ($LOQ = 1,33 \times LOD$). U enzymatických metod byl limit detekce (LOD) převzat z příruček enzymových setů (K-ISOC a r-Biopharm) a přepočten na $\Delta A = 0,1$ (viz



Obr. 3. Elektroforeogram vzorku P1 – metoda CZE

tab. VI)^{8,14}. Minimální detekovatelná délka vlny u kapilární izotachofórey (CITP I i CITP II) je 1 s, což odpovídá koncentraci 2,3 mg l⁻¹ ICA pro CITP I a 0,7 mg l⁻¹ pro CITP II. Pro CZE byla minimální detekovatelná plocha 1 mV s, což odpovídá koncentraci 0,7 mg l⁻¹ D-isocitronové kyseliny. Výtěžnost metod (viz tab. VI) byla u enzymových setů ověřena pomocí 20% a 50% přídavku standardu D-isocitronové kyseliny (deklarovaná koncentrace ICA 0,3 mg ml⁻¹; ze setu Megazyme) a u elektromigračních metod byl přídavek 10, 20 a 160 mg l⁻¹ kyseliny DL-isocitronové.

Závěr

Enzymatická metoda (přesněji postup Megazyme*, cit.⁸) byla vybrána jako nejvhodnější analytická metoda pro stanovení D-isocitronové kyseliny (ICA) ve všech maticích a v referenčním materiálu (viz tab. V). Byla vybrána na základě zjištěné výtěžnosti (viz tab. VI) a robustnosti metody (není tolik závislá na typu matrice). Významnou roli hrála i schopnost stanovit volnou a celkovou ICA. Je též označena jako uznaná metoda akceptovaná EN, NEN, NF, DIN, GOST, IFU a AIJN.

Velmi slibnou metodou se jeví CZE, kterou byly získány obdobné výsledky (viz tab. V) jako u metody Megazyme* (cit.⁸) (až na vzorky K1 a K2). Použitelnost elektromigračních metod pro všechny studované matrice vzorků by vyžadovala optimalizaci podmínek separace (zvýšení separační kapacity vhodnou úpravou složení elektrolytů nebo použití delší separační kapiláry). Zvláště pro vzorky kečupů, kdy musel být prodloužen čas separace v předseparační kapiláře, aby došlo k odseparování chloridů (specifické podmínky). V ideálním případě by pro stanovení CA a MA bylo zapotřebí většího ředění. Tím se ale dostaneme pod LOD pro ICA.

Koncentrace D-isocitronové kyseliny a poměr CA/ICA může společně s dalšími stanovenými markery (např. titrační kyselostí, formolovým číslem, organickými kyselinami, cukry a minerálními látkami) sloužit k určení autenticity a kvality výrobků z ovoce (případně zeleniny).

Seznam zkratk a symbolů

ΔA	rozdíl absorbancí ($\Delta A(\text{vzorku}) = A_2 - A_1 - \Delta A(\text{blank})$)
BGE	základní elektrolyt (z angl. background electrolyte)
BTP	bistrispropan
CA	citronová kyselina (z angl. citric acid)
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CITP	kapilární izotachofórea
CoP	Code of Practice
EA	elektroforetický analyzátor
FIA	průtoková injekční analýza (biosenzor)
ICA	D-isocitronová kyselina (z angl. isocitric acid)
J	jahodové džemy (J1 – J3)
K	kečupy (K1 – K3)
LE	vedoucí elektrolyt
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MA	jablečná kyselina (z angl. malic acid)
Megazyme	převzatý pracovní postup (dle článku Wallrauch a Greiner ¹⁷)
Megazyme*	upravená část pracovního postupu (úprava pH na 6–7, místo přídavku 5 ml 4M HCl, před přidáním pufru)
MHEC	methylhydroxyethylcelulosa
NADP (NADPH)	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (redukována forma)
P	100% pomerančové džusy (P1 – P3)

RM referenční materiál
TE koncový elektrolyt

LITERATURA

- Kamzolova S. V., Dedyukhina E. G., Samoilenko V. A., Lunina J. N., Puntus I. F., Allayarov R. L., Chiglintseva M. N., Mironov A. A., Morgunov I. G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9133 (2013).
- Aurich A. a 11 spoluautorů: *Subcellular Biochem.* 64, 391 (2012).
- Morgunov I. G., Karpukhina O. V., Kamzolova S. V., Samoilenko V. A., Inozemtsev A. N.: *Preparative Biochem. Biotechnol.* 48, 1 (2018).
- Lachowicz S., Oszmianski J., Seliga L., Pluta S.: *Molecules* 22, 853 (2017).
- Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EEC (AIJN): Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices. A.I.J.N, Belgium, (Reference guidelines, revize 2011).
- Kodama S., Aizawa S., Taga A., Yamamoto A., Honda Y., Suzuki K., Kemmei T., Hayakawa K.: *Electrophoresis* 34, 1327 (2013).
- Karášková P.: *Bakalářská práce*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2008.
- Booklet: D-isocitric acid (D-isocitrate), assay procedure, Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, K-ISOC 02/16, 11 (2016).
- Kvasnička F., Voldřich M., Pys P., Vinš I.: *J. Food Comp. Anal.* 15, 685 (2002).
- Stój A., Targoński Z.: *Polish J. Food Nutr. Sci.* 56, 41 (2006).
- Navarro-Pascual-Ahuir M., Lerma-Garcia M. J., Simo-Alfonso E. F., Herrero-Martinez J. M.: *Food Anal. Meth.* 10, 3991 (2017).
- Wilson M. K.: *Dissertation*. University of Maryland in Baltimore, USA 2011.
- Kim M., Kim M. J.: *Food Res. Int.* 36, 223 (2003).
- Booklet D-isocitric acid UV method, Boehringer Mannheim/r-Biopharm, Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, Roche Diagnostics, Cat. No. 10 414 433 035, 4 (2017).
- Ježek J., Suhaj M.: *J. Chromatogr. A* 916, 185 (2001).
- ČSN EN 1139: *Ovocné a zeleninové šťávy – Enzymové stanovení obsahu kyseliny D-isocitronové – NADPH spektrofotometrická metoda* (říjen 1996).
- Wallrauch S., Greiner G.: *Flüssiges Obst* 44 (1977).
- Saavedra L., Garcia A., Barbas C.: *J. Chromatogr. A* 881, 395 (2000).
- Sádecká J., Polonský J., Šimko P., Karasová G.: *Eur. Food Res. Technol.* 213, 161 (2001).
- Karovicova J., Kohajdová Z., Kukurová K., Lehkozi-vova J.: *Żywność Nauka Technologia Jakość* 14, (2007).
- Garway S. D., Garway D. G., Gaikwad Y. T., Azad R. M., Dhokey Y. B., Patel S. N., Pandya G. H.: *Asian J. Res. Chem.* 5, 299 (2012).
- Wollseifen H. R., Kretschmer T.: *Macherey-Nagel (MN) application note* (2017).

T. Podskalská, F. Kvasnička, and H. Čížková
(*Department of Food Preservation, University of Chemistry and Technology in Prague*): **Methods for Determination of D-Isocitric Acid in Fruit Products**

Among other things, D-isocitric acid is used as a marker to assess the authenticity and quality of fruit (and vegetable) products. The ratio of citric/D-isocitric acid is accepted as an indicator of adulteration of fruit juices by an unauthorized acidification. The aim of the presented paper was to choose the most suitable method to determine D-isocitric acid in three different matrices (orange juice, strawberry jam, and ketchup) and the selected reference material (from the offer of the DRRR Co.). The following methods were verified and compared: two enzyme assays (from Megazyme and r-Biopharm), capillary isotachophoresis (two electrolyte systems) and capillary zone electrophoresis. Based on the analyses performed, the enzyme assay kit from Megazyme was chosen as the most suitable analytical method for the determination of D-isocitric acid. This choice was done using performance characteristics of that method, such as the limit of quantification (35 mg kg^{-1} for liquid samples and 25 mg kg^{-1} for solid samples), repeatability (2.4%), recovery (101–113%), values achieved for the D-isocitric acid concentration in the test samples ($29\text{--}126 \text{ mg kg}^{-1}$), and the ability to determine free and total D-isocitric acid.

Keywords: D-isocitric acid, enzyme assay kit, capillary isotachophoresis, capillary zone electrophoresis