

Vliv vybraných faktorů na degradační změny aspartamu

Bc. Tomáš Marcin

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš Marcin**
Osobní číslo: **T11708**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin – specializace Technologie mléka a mléčných výrobků**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vybraných faktorů na degradační změny aspartamu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte aspartam, jeho výrobu a fyzikálně-chemické vlastnosti.
2. Popište degradační změny aspartamu s ohledem na potravinářsky významné faktory.

II. Praktická část

1. Provedte experimenty, ve kterých budete sledovat úbytek aspartamu v závislosti na teplotě a pH prostředí. Provedte také časovou závislosti výše zmíněných faktorů.
2. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.

Rozsah diplomové práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:


- [1] Stryer, L.; et al. Biochemistry 5th Edition, 2002th ed.; W H Freeman: New York, 2002.
[2] Shing-Chen, W.; Cheanyeh, Ch. Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivation fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 2011, 1218, 2976-2983.
[3] Berset, J.; Ochsenbein, N. Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Chemosphere 2012, 88, 563-569.
[4] Tsang, W.; Clarke, M. A.; Parrish, F. W. Determination of Aspartame and Its Breakdown Products in Soft Drinks by Reverse-Phase Chromatography with UV Detection. Food Chemistry 1985, 33, 734-738.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. František Buňka, Ph.D.**
Ústav technologie potravin
Datum zadání diplomové práce: **16. ledna 2013**
Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na charakteristiku aspartamu a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Bude zkoumat vnější vlivy podporující degradaci aspartamu a také do jaké míry jsou na sobě závislé jednotlivé faktory prostředí. Tato práce potvrzuje nestabilitu aspartamu ve vodném prostředí s různým pH a jeho degradaci na fenylalanin, aspartylfenylalanin a diketopiperazin. Také byla zjištěna vyšší míra degradace pro neutrální a alkalické pH nežli pro kyselé pH. Teplotní stabilita aspartamu byla prokázána jako snižující se s rostoucí teplotou i v závislosti na pH.

Klíčová slova: aspartam, diketopiperazin, aspartylfenylalanin, HPLC, pH, čas

ABSTRACT

The thesis is focused on the characteristics of the aspartame and its physico-chemical properties. It will examine the external influences that support the degradation of the aspartame and also to what extent they are dependent on each individual environmental factors. This study confirms the instability of aspartame in aqueous environments with varying pH and its degradation to phenylalanine, diketopiperazine and aspartylphenylalanin. Higher rate of degradation was also found for neutral and alkaline pH than for the acid pH. Thermal stability of the aspartame has been shown to be decreasing with increasing temperature in dependence on pH.

Keywords: aspartame, diketopiperazine, aspartyl phenylalanine, HPLC, pH, time

Děkuji panu doc. Ing. Františku Buňkovi za pomoc a odborné vedení mé diplomové práce. Dále děkuji firmě Agrobac s.r.o. za spolupráci a odbornou pomoc. Moje poděkování také patří paní Ing. Evě Lorencové za pomoc s experimentálním měřením a v neposlední řadě mé rodině a mým blízkým, kteří mě podporovali a pomáhali mi.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 NÁHRADNÍ SLADIDLA	12
1.1 ASPARTAM	13
1.1.1 Historie	14
1.1.2 Použití	14
1.1.3 Vlastnosti.....	15
1.2 ACESULFAM DRASELNÝ	24
1.2.1 Historie	25
1.2.2 Použití	25
1.2.3 Vlastnosti.....	26
1.3 SACHARIN	26
1.3.1 Historie	27
1.3.2 Použití	27
1.3.3 Vlastnosti.....	28
2 MOŽNOSTI STANOVENÍ ASPARTAMU	29
2.1 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ POMOCÍ HPLC	29
2.1.1 Analytické metody	29
2.1.2 Přípravy vzorků potravin.....	32
2.2 VLIV pH NA DEGRADACI ASPARTAMU	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
3 CÍL PRÁCE	38
4 MATERIÁL A METODY	39
4.1 POPIS EXPERIMENTU	39
4.2 EXPERIMENT A.....	39
4.2.1 Chemikálie	39
4.2.2 Pomůcky a přístroje.....	40
4.3 EXPERIMENT B	41
4.3.1 Chemikálie	41
4.3.2 Pomůcky a přístroje.....	41
4.4 POPIS PŘÍPRAVY A MĚŘENÍ	42
4.4.1 Chromatografické podmínky pro stanovení a separaci produktů v závislosti na pH a teplotě	42
4.4.1.1 Experiment A	42
4.4.2 Příprava standardů a roztoků pro experiment A.....	42
4.4.2.1 Experiment B	43
4.4.3 Příprava standardů a roztoků pro experiment B.....	43
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1 VÝSLEDKY PILOTNÍHO POKUSU STANOVENÍ ASPARTAMU A JEHO DEGRADAČNÍCH PRODUKTŮ V ZÁVISLOSTI NA pH (EXPERIMENT A)	45
5.2 EXPERIMENT B	48
5.2.1 Výsledky měření z kalibrační křivky	48

5.2.2	Výsledky stanovení míry degradace aspartamu na vnějších podmínkách (Experiment B)	51
5.2.2.1	Závislost míry degradace aspartamu na pH a čase	51
5.2.3	Teplotní závislost degradace aspartamu při různém pH	54
5.3	SOUHRNNÁ DISKUZE	59
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK.....	72
	SEZNAM PŘÍLOH.....	73

ÚVOD

Aspartam je náhradní sladidlo. Jedná se o jedno z nejpoužívanějších náhradních sladidel posledních 30 let. Je běžnou součástí velké a různorodé skupiny potravin, jimž dodává sladkou chuť, avšak není výrazným zdrojem energie, jako jsou cukry.

Jako náhradní sladidlo je vyráběn chemickou cestou, a podléhá tak přísným požadavkům legislativy na aspartam. Kontroverznost umělých sladidel je předmětem mnoha diskuzí a výzkumů ohledně jejich bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti. Proto je pro ně stanovena doporučná denní dávka (ADI – Acceptable Daily Intake), která zaručuje při nepřekročení zdravotní nezávadnost. Avšak u osob, které trpí atypickými problémy, nelze na obecnou ADI spoléhat a je třeba konzultovat vedlejší účinky náhradních sladidel. Aspartam je zdrojem fenylalaninu, a proto by jej neměli konzumovat lidé trpící fenylketonurií. Aspartam se často užívá ve směsi s jinými náhradními sladidly. Na rozdíl od sacharidů není kariogenní a má téměř zanedbatelný energetický obsah, a proto je užíván ve výrobcích pro diabetiky a pro diety lidí trpících nadváhou.

Aspartam je však ve vodných roztocích nestabilní v závislosti na pH a teplotě prostředí. K jeho stanovení je možné využít metodu HPLC/UV-VIS. Tato práce se zaměřuje na stanovení aspartamu a jeho podmínek degradace a také stanovení degradačních produktů.

V teoretické části byl charakterizován aspartam a jeho fyzikálně–chemické vlastnosti. Dále byly popsány jeho degradační změny a podmínky, za kterých k nim dochází, a jakým způsobem se tak děje. V praktické části byly provedeny experimenty, ve kterých byly sledovány úbytky aspartamu v závislosti na pH prostředí a teplotě. Byla také provedena časová závislost degradace aspartamu s různým prostředím pH.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 NÁHRADNÍ SLADIDLA

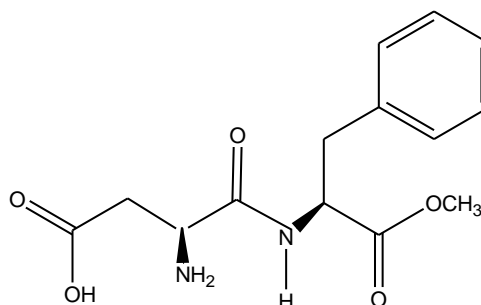
Legislativní požadavky na náhradní sladidla lze nalézt ve směrnici Evropského parlamentu a Rady Evropy 1333/2008, o přídatných látkách, dále v pozdějším znění ve směrnici Evropského parlamentu a Rady Evropy 1130/2011 a 1129/2011. V české legislativě jsou tyto požadavky ve vyhlášce 4/2008 Sb. aktualizované vyhláškou 130/2010 Sb. a 122/2011 Sb., kterou se stanovují druhy a podmínky použití náhradních sladidel při výrobě potravin. V této vyhlášce jsou vymezeny pojmy, podmínky použití náhradních sladidel při výrobě potravin, požadavky na jejich čistotu a označování potravin se sladidly. Legislativou povolená náhradní sladidla jsou: „acesulfam - K, aspartam, kyselina cyklámová a její sodná a vápenatá sůl (počítáno jako volná kyselina), sacharin a jeho soli (sodná, draselná, vápenatá sůl, počítáno jako volný amid), sukralosa, thaumatin, neohesperidin DC, neotam, sůl aspartamu – acesulfamu.“ Těmto náhradním sladidlům patří také příslušné E-kódy stanovené ve vyhlášce 130/2010 Sb. (viz Tabulka 1)

Tabulka 1 Povolená sladidla a jejich E – kódy

Sladidlo	E - kód
Acesulfam K	E 950
Aspartam	E 951
Sorbitol	E 420
Mannitol	E 421
Isomlalt	E 953
Kyselina cyklámová a její sodná a vápenatá sůl	E 952
Sacharin a jeho soli	E 954
Sukralosa	E 955
Thaumatin	E 957
Neohesperidin DC	E 959
Neotam	E 961
Sůl aspartamu – acesulfamu	E 962
Maltitol	E 965
Laktitol	E 966
Xylitol	E 967
Erythritol	E 968

Pojmem sladidla jsou myšleny látky, které dávají potravině sladkou chuť a nahrazují přírodní sladidla a med, zatímco pojem sladidla se stává synonymem pojmu náhradní sladidla. V odborné literatuře lze nalézt také výrazy umělá sladidla a polyalkoholy. Ve smyslu náhradních sladidel jsou to potravinářské přísady s vyšším sladícím efektem nežli cukr, ale zároveň s menším využitelným energetickým obsahem. Náhradní sladidla mohou být povahy syntetické či přírodní. Každé sladidlo má svou sladivost, která bývá definována ke sladivosti čistého (100%) disacharidu sacharózy, jenž má sladivost 1, všechna další sladidla se od něj poměrově odvíjí. Sladidla mají nízký obsah kalorií, kromě toho jsou také nekariogenní, jelikož neposkytují energii pro bakterie v dutině ústní. Náhradní sladidla mohou mít sladkou chuť odlišnou od klasického cukru a také odeznívání sladké chuti bývá atypické. Jsou vhodná pro diabetiky a pro lidi trpící nadváhou. Protože se jedná o přídatné látky, je hlídána jejich bezpečnost pro lidské zdraví a pro každé takovéto aditivum je udána ADI (povolená denní dávka), která udává množství na kg hmotnosti konzumenta na den. Většina negativních zpráv jsou jen moderní mýty a poplašné zprávy. Náhradní sladidla se takto stávají pro potravináře levnou náhražkou klasických sladidel. Většina těchto látek má svou maximální přípustnou koncentraci či maximální použitelnou dávku pro danou potravinu. Mohou být používány samostatně či ve směsích kdy dochází k potlačení nežádoucích vlastností a zvýšení požadovaných účinků. Mezi první nejstarší a dodnes používaná náhradní sladidla patří sacharin, aspartam a acesulfam.[1, 2, 3, 12, 13]

1.1 Aspartam



Obrázek 1 Aspartam

Jedná se o jedno z nejužívanějších a zároveň nejkontroverznějších náhradních sladidel. Chemicky se jedná o N-L- α -aspartyl-L-fenylalanin 1-methyl ester. Jeho sladivost

bývá hodnocena jako 180x větší než u sacharózy. Toto náhradní sladidlo nemá žádné výraznější vedlejší pachuti a odeznívání je pozvolnější než u sacharózy. Doporučené dávkování je stanoveno FDA na 40mg na 1kg tělesné hmotnosti na den. Zároveň jsou také stanoveny maximální přípustné hodnoty pro jednotlivé druhy potravin. Aspartam a jeho rozkladné produkty byly předmětem rozsáhlého zkoumání více než 30 let, včetně pokusů na zvířatech, klinických výzkumech a epidemiologických studiích. První podklady negativních ohlasů byly dány v polovině devadesátých let studií provedenou Ramazziniho nadací, která poukazovala na negativní dopady užívání aspartamu, jako zvýšené riziko nádorů a zvýšení pravděpodobnosti leukémie. Tato studie však byla ihned po vydání napadána pro nepředložení nezávislých závěrečných přezkoumání, pokusy nebyly provedeny dle správné laboratorní praxe, nebyl prokázán zdroj financování této práce. Navíc je třeba brát v potaz rozsáhlý soubor studií s údaji o působení na lidi a prokazující bezpečnost aspartamu. EFSA vydala tři studie o bezpečnosti aspartamu v letech 2006, 2009 a 2010. Ve všech třech studiích byl závěr, že aspartam je bezpečný a není ani třeba měnit ADI. Avšak lidé trpící fenylketonurií by se měli aspartamu vyhnout, a to kvůli degradačnímu produktu fenylalaninu, protože jeho nadměrný příjem by vedl u těchto osob k bolestem hlavy a až k poškození mozku.[1, 12, 15, 16, 17]

1.1.1 Historie

Historie aspartamu se začala psát roku 1965, kdy byl při biotestech ve farmaceutické společnosti GD Searle syntetizován aspartylfenylalanin-metyl-ester (ASM). Téhož roku se podařilo rekrystalizovat ASM z etanolu. Tato krystalická látka ulpěla po seškrabání ze stěn baňky Jamesovi Schallerovi na prstech, po olíznutí prstů při listování papíry zaznamenal sladkou chuť a uvědomil si spojitost s onou bílou krystalickou sloučeninou (aspartamem). Zároveň s předpokladem, že nejde o toxickou látku, jej ochutnal a potvrdil si, že se jedná o sloučeninu mající sladkou chuť (ASM). K použití v potravinách byl schválen v roce 1983. Dnes je již aspartam jedním z nejpoužívanějších náhradních sladidel.[1, 12, 17]

1.1.2 Použití

„Použití v potravinách jako je pečivo (zákusky, dezerty, polevy, dezertové směsi, polevové směsi, náplně, plnicí směsi), pekařské výrobky (enkapsulovaný aspartam),

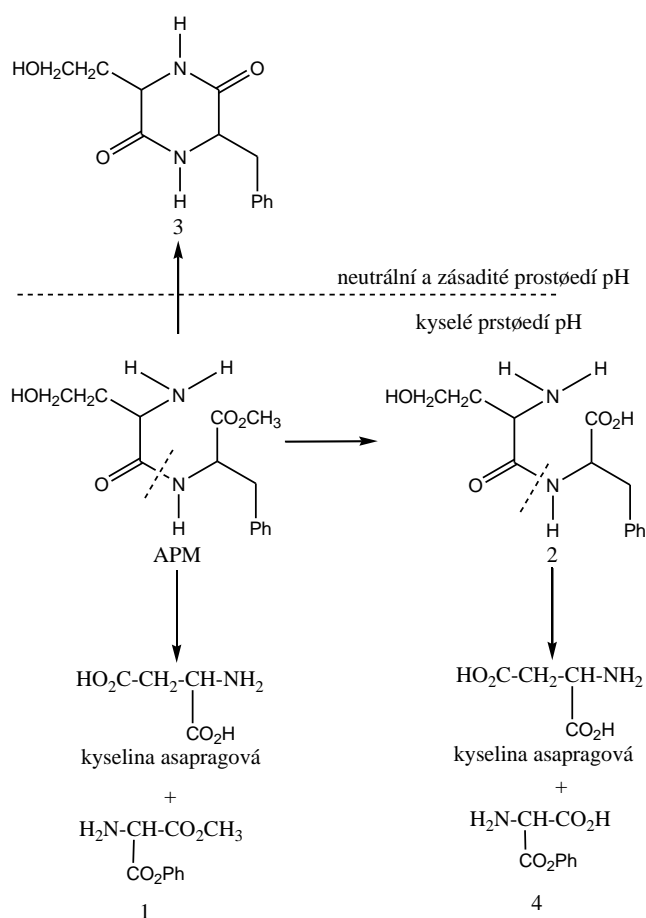
pekárenské směsi (zapouzdřený aspartam), mléko a mléčné výrobky (suché směsi mléka a mléčných výrobků, mražené dezerty), nápoje (nápojové koncentráty, čajové nápoje, nápojové směsi), obiloviny a výrobky z obilovin, nealkoholické nápoje, cukr, cukernaté zavařeniny a cukrovinky (necukerné sirupy, džemy a želé, cukrářské glazury), ostatní (farmaceutické tablety, žvýkačí vitaminy, žvýkačí gummy, emulze, pastilky, osvěžovače dechu), ocet, nálevy a omáčky (salátové dresinky, přísady), ovoce, zelenina a podobné (arašidy a jiné druhy ořechových pomazánek).“ ASM má v potravinách funkci intenzivního sladidla (180 x sladivosti sacharózy) používaného hlavně v sycených nápojích. V závislosti na pH je nestabilní ve vodném prostředí: při pH 3.5 je 50-60% degradováno po 36 dnech, při pH 7.4 je po 9 dnech degradace úplná. Stabilita pevného aspartamu je 5 let za vakua v chladu a suchu. Nelze jej použít do výrobků, které budou jakkoliv tepelně upravené, výjimkou jsou šoková teplotní ošetření. Může být použit do okyselených tekutých výrobků a kyselých sycených nápojů. Rozpustnost je dostatečná pro většinu technologických postupů, avšak kyselé prostředí v potravinách či mírně zvýšená teplota rozpustnost zvyšuje. Může být použit u mléčných výrobků, které jsou ošetřeny vysokoteplotními, ale časově krátkými operacemi. Avšak u mléka je třeba brát na zřetel jeho vlastní pufrací schopnosti, a tudíž jejich vliv na degradaci aspartamu. Aspartam má profilově podobnou chuť jako sacharóza, chuťový profil dosáhne výrazného zlepšení po použití různých ovocných přísad, jako jsou aroma či různé esence. Legislativní limity viz Příloha P 1.[2]

1.1.3 Vlastnosti

ASM je bílý krystalický prášek anebo bezbarvé jehlice, bez zápachu. Má čistou sladkou a příjemnou chuť a podlouhlé odeznívání sladké chuti, bez hořké či kovové příchutě. Je tvořen L-asparagovou kyselinou a metylesterem L-fenylalaninu. Je mírně rozpustný ve vodě (20°C, pH 4,5-6,0 rozpustnost 38%) a dobře rozpustný v etanolu (25°C rozpustnost 100%), v oleji je nerozpustný. Stabilita aspartamu se stala tématem mnoha vědeckých studií, kdy se po výzkumu dospělo k názorům o závislostech degradace ASM na pH, koncentracích pufracích látek a jejich typech a na teplotě. Byly identifikovány různé rozkladné produkty jako L-asparagová kyselina, L-aspartylfenylalanin, diketopiperazin, L-fenylalanin. Pro stanovení degradačních produktů a stanovení samotného ASP je nejčastěji používána HPLC. Studium vlastní degradace bývá založeno na užití či neuzití pufrů, jejichž nejčastější zástupce bývá fosforečnan-citrátový pufr. Také

byly provedeny studie v závislostech na pH v rozmezích od 2 do 12 a v závislostech na různých teplotách.[2]

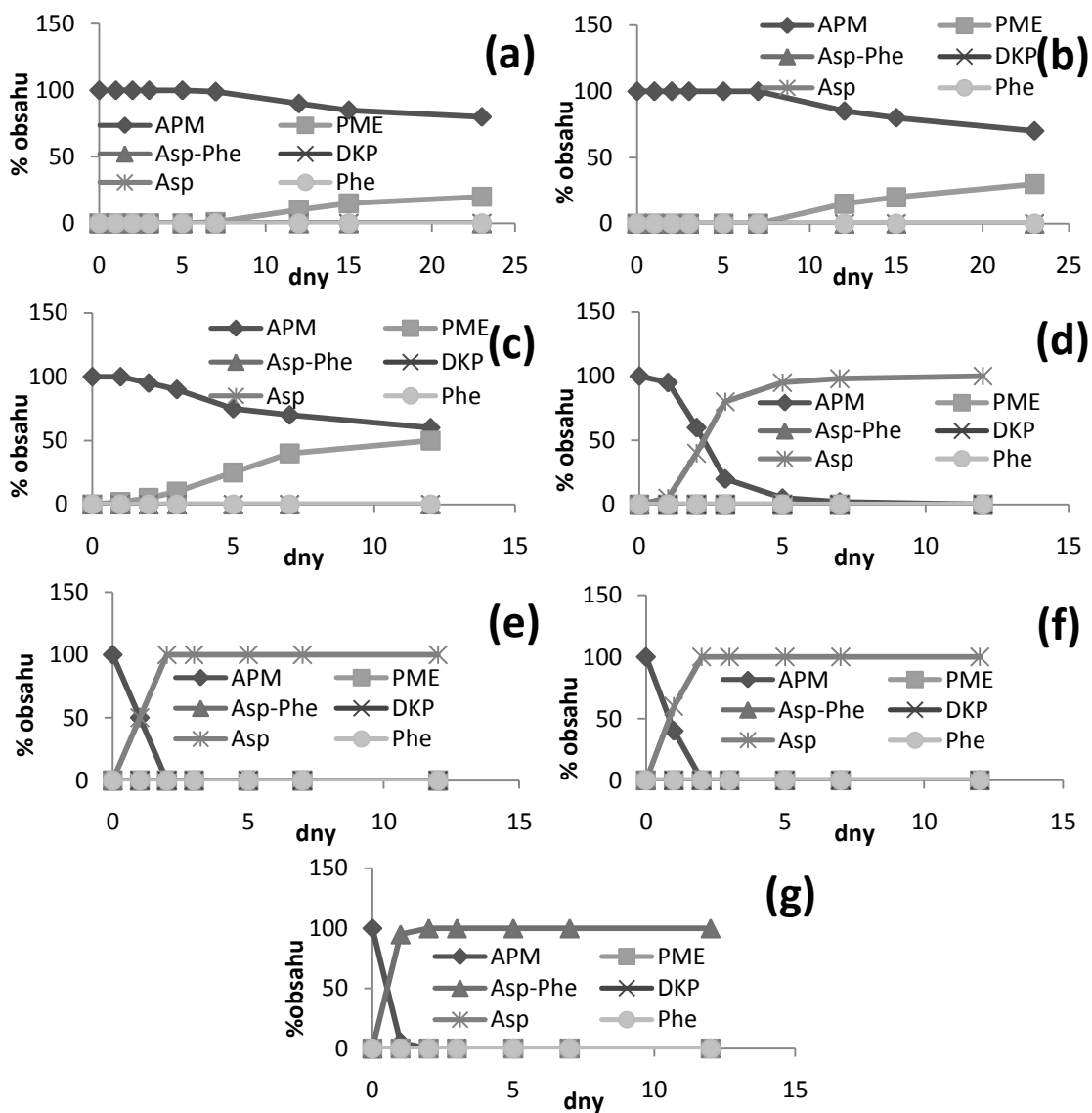
Z chemického hlediska může esterová vazba obsažená v aspartamu podléhat hydrolýze a aspartam se pak může rozkládat dvěma možnými drahami. V jedné dráze je dominantní rozkladný produkt aspartylfenylalanin za současného uvolnění metanolu, anebo druhou drahou vzniká dominantně diketopiperazin za současného uvolnění metanolu. Kromě těchto dvou drah byly detekovány i rozklady aspartamu na kyselinu asparagovou a metylester fenylalaninu, ze kterého uvolněním metanolu vzniká fenylalanin.[2,3,23]



Obrázek 2 Degradace aspartamu (APM), 1 - metylester fenylalaninu, 2 – aspartylfenylalanin, 3 - diketopiperazin, 4 – fenylalanin [10]

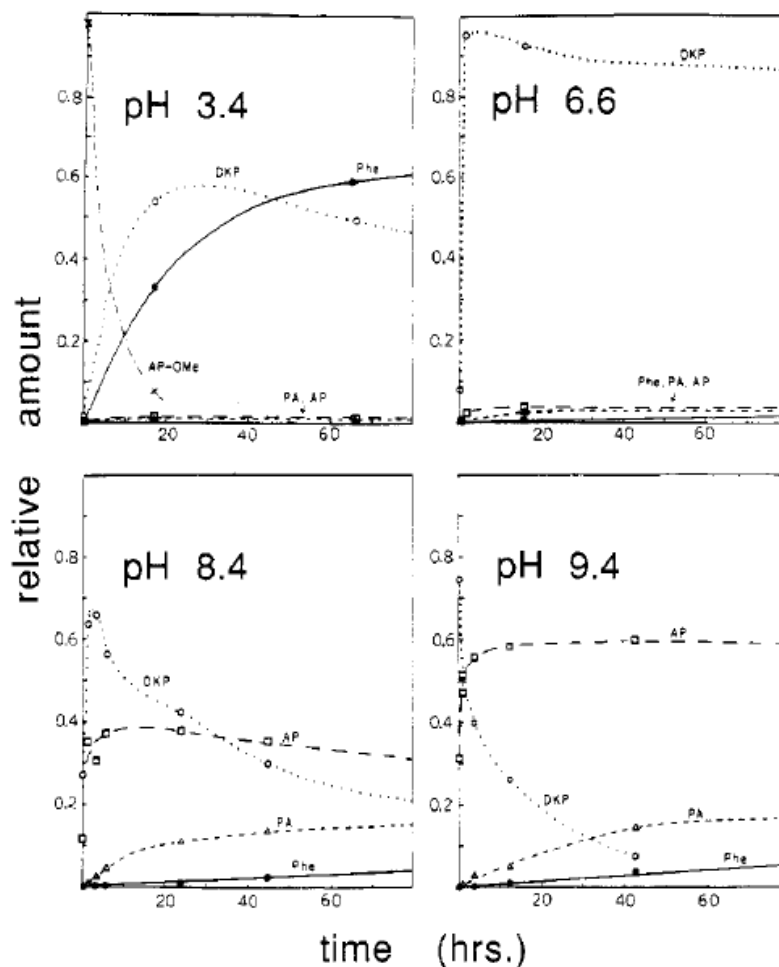
Při výzkumech bylo zjištěno, že degradace aspartamu je pomalejší v mírně kyselé oblasti pH než v jeho neutrální a zásadité oblasti. Hlavní rozkladný produkt pro kyselé pH je L-fenylalanin metylester a aspartylfenylalanin. V důsledku toho dochází k hydrolýze

aspartamu na jeho stavební peptidy. V neutrálním až zásaditém pH je osamocený elektronový pár na aminoskupině asparagové kyseliny zodpovědný za počátek cyklizace s karbonylovým uhlíkem metylesteru fenylalaninu a vzniká tak cyklická struktura diketopiperazinu, která je tvořena za uvolnění metanolu (viz Obrázek 2, 3 a 9).[3, 19, 24, 26]



Obrázek 3 Degradace aspartamu ve fosforečno-citrátovém pufru o pH 2 (a), 4 (b), 6 (c), 7 (d), 8 e), 10 (f) a 12 (g), při 4°C. APM – aspartam, Asp – Phe – aspartylfenylalanin, Asp – asparagová kyselina, PME – metylester fenylalaninu, DKP - diketopiperazin, Phe – fenylalanin [19]

V dalších pracích byl také zkoumán vliv teplot a jejich závislost na stabilitu aspartamu. Při vysokých teplotách dochází k rozkladu aspartamu na diketopiperazin ovšem v různých koncentracích dle daného pH. Při nízkém pH je hlavní reakce hydrolytická, cyklizace esteru na diketopiperazin je potlačena a přednost má rychlá hydrolyza na jednotlivé aminokyseliny, poté dojde i k otevření cyklu diketopiperazinu na dipeptid a k jeho následné hydrolyze na jednotlivé aminokyseliny. V neutrální oblasti pH je vznik



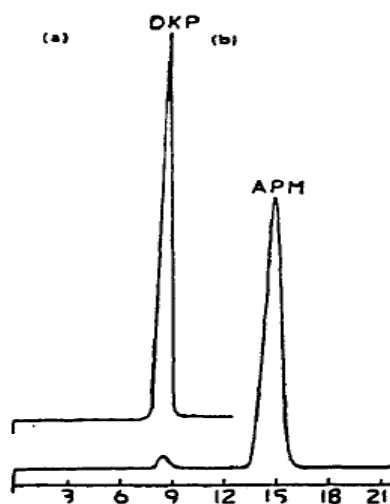
Obrázek 4 Vznik degradačních produktů ASP v čase při 100°C v závislosti na pH.

Kde $\circ\cdots\circ$ je diketopiperazin, \square je aspartylfenylalanin, Δ je fenylalanin-aspartamová kyselina a \bullet je fenylalanin. Koncentrace aspartamu nebyla měřena, ale měla by odpovídat koncentraci fenylalaninu [4, 28, 29]

diketopiperazinu mnohem rychlejší, a to z cyklu na fenylalaninu a metylesteru, podíl diketopiperazinu pak mírně klesá, jak dochází k vyrovnání jeho poměru s dipeptidy. Rychlost hydrolyzy dipeptidů je poněkud pomalejší než tvorba diketopiperazinu kvůli

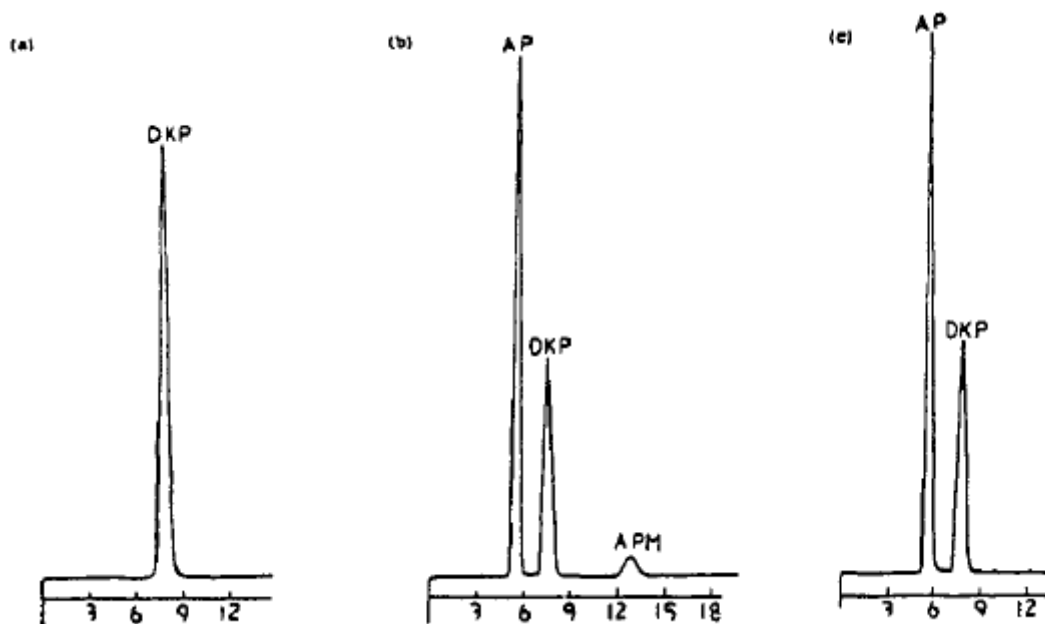
tendenci zachování poměru vzniklých dipeptidů, zatímco koncentrace fenylylalaninu lineárně roste s časem. V mírně zásaditém prostředí dochází k rychlé přímé cyklizaci aspartamu a vzniku diketopiperazinu, ale s časem dochází k vyrovnání s rozkladnými produkty dipeptidu. V zásaditém prostředí pH je již rozklad tak rychlý, že již v časovém úseku několika minut dojde ke vzniku maxima diketopiperazinu a poté klesá, zatímco koncentrace dipeptidů narůstá. [4, 25, 27]

Některé provedené studie prokazují, že aspartam je velmi reaktivní s aldehydy, které jsou hlavními chuťovými látkami používanými u žvýkaček a některých nealko nápojů. Většinou byly všechny studie provedeny za běžného složení výrobku bez vyizolování aspartamu z matrice výrobku. Proto byla vyvinuta HPLC metoda s reverzní fází a metodou gradientové eluce pro samostatný aspartam, aspartylfenylalanin a diketopiperazin. Nápoje byly skladovány při teplotě $22 \pm 1^\circ\text{C}$ po různě dlouhou dobu. Při zahřevu aspartamu dochází k cyklizaci na diketopiperazin a vzniku jedné molekuly metanolu. Pomalou tvorbu diketopiperazinu (viz Obrázek 4) lze také pozorovat při rozpuštění aspartamu ve vodných roztocích za normálních laboratorních podmínek. Tento důležitý poznatek je třeba si uvědomit pro objektivní stanovení diketopiperazinu. Při izokratickém stanovení roztoku aspartamu o koncentraci 0,05% upraveného na pH 8 pomocí zředěného roztoku NaOH při teplotě místnosti (22°C) byly po 4 hodinách zjištěny 2 produkty na úkor obsahu aspartamu. [10, 29, 30]



Obrázek 5 Izokratická eluce (a) diketopiperazin (DKP) asi 2%, (b) aspartam (ASP) standard (22°C , 4 hodiny) [10]

Prvním produktem byl aspartylfenylalanin a druhým diketopiperazin. Po 24 hodinách byl aspartam zcela degradován za vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu, kdy pík diketopiperazinu představoval 37% hydrolyzy z rozkládajícího se aspartamu. V rámci této studie byly také otestovány tržní produkty za stejných podmínek a v časových intervalech dle požadavků na skladování a spotřebu produktů.[10, 29, 30]



Obr. 4

Obrázek 6 Izokratická eluce (a) standard diketopiperazinu, (b) hydrolyza ASP při pH 8 po 4 hodinách, (c) hydrolyzy ASP při pH 8 po 24 hodinách[10]

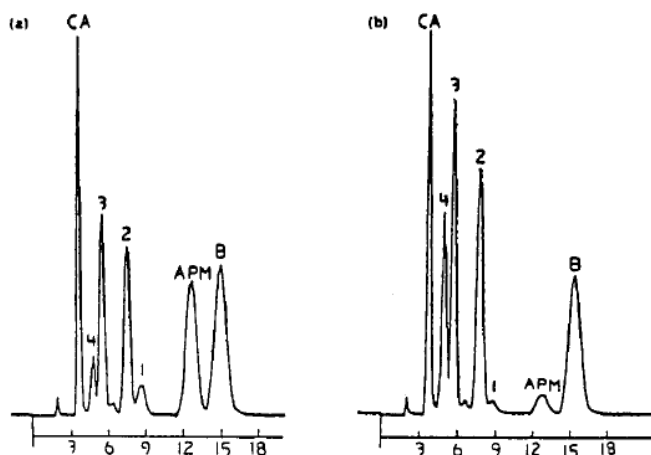
Tabulka 2 Obsah aspartamu v nealko-nápojích uložených při $22\pm 1^\circ\text{C}$ [10]

	limetko-citrónová no. 1	limetko-citrónová no. 2	dietní cola no. 1	dietní cola no. 2
čerstvé	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
1 měsíc	89,70%	87,30%	94,00%	84,50%
6 měsíců	56,90%	36,90%	38,20%	28,20%
36 měsíců	13,72%	6,40%	4,10%	3,58%

Jak je vidět v Tabulce 2, lze usuzovat na nestabilitu aspartamu v nápojích při jejich skladování po delší dobu při $22\pm 1^\circ\text{C}$. Všechny vzorky s jedinou výjimkou obsahovaly po 6 měsících méně než 40% původního obsahu aspartamu a po 36 měsících skladování

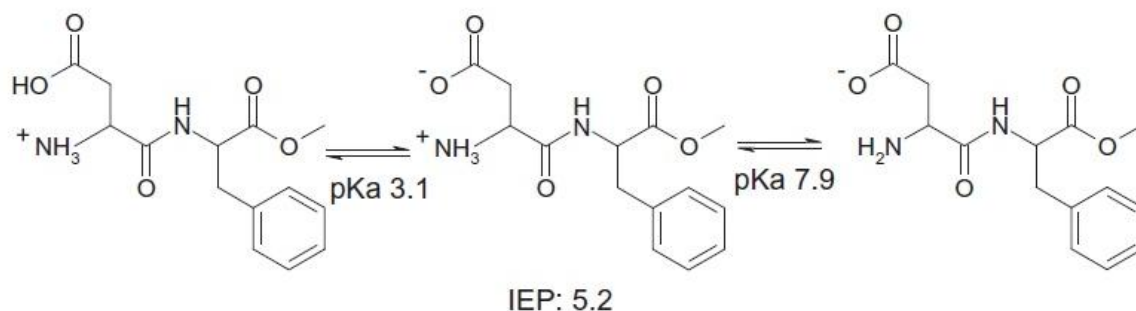
vykazovaly opět 3 ze 4 vzorků méně než 10% původního aspartamu. Za pouhé 4 týdny došlo k rozkladu 10% aspartamu ve většině vzorků.[10, 30]

Tato studie umožnila rozvoj různých sloučenin v průběhu času. Sloučeniny, které odpovídají diketopiperazinu a aspartylfenylalaninu, jsou hlavními rozkladnými produkty vznikajícími po delší době skladování. L-fenylalanin metylester byl minoritní produkt, zatímco významný nárůst měl fenylalanin (viz Obrázek 3).[10, 30]



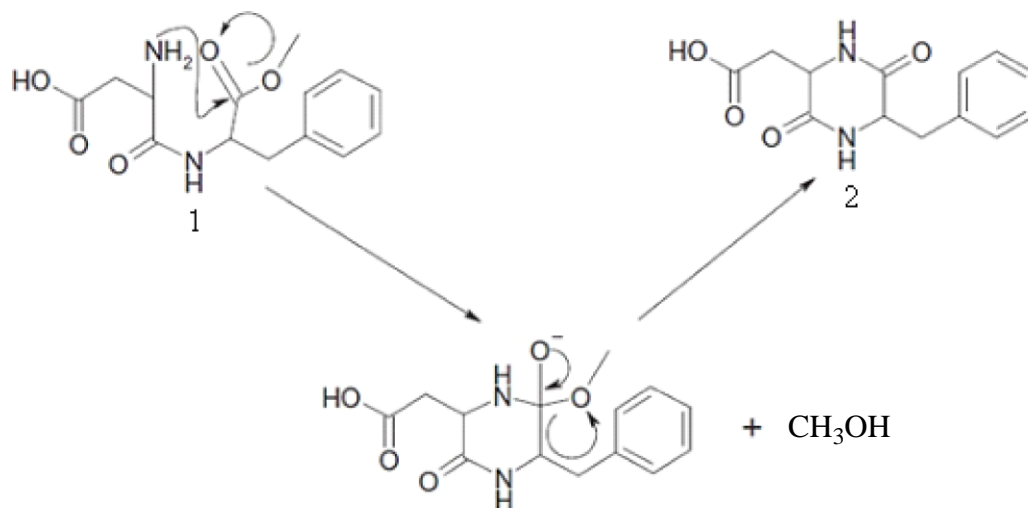
Obrázek 7 Srovnání HPLC-UV chromatogramů v dietní limetko-citrónové limonádě po 6 měsících (a) a po 36 měsících (b) při $22\pm 1^\circ\text{C}$. Píky: APM - aspartam, B - benzoan sodný, CA - kyselina citrónová (L – asparagová kyselina), 1 - fenylalanin metylester, 2=DKP, 3 - aspartylfenylalanin, 4 – fenylalanin [10]

Obsah a stabilita aspartamu se staly také předmětem dalších studií, kdy byla za prostředí brána čistá voda, popřípadě její surové složení, které se lišilo dle zdroje, ze kterého voda pocházela. Zkoušené vzorky se podrobily úpravě pH na hodnoty kolem 4 a 8 pH a také došlo ke dvěma úpravám teplot a to na 4 a 20 °C. Jednotlivé řady byly upraveny na pH 4 a 8 a skladovány při teplotě 4°C a 20°C v průběhu celého měření, jako simulace reálného prostředí aspartamu. Při tomto výzkumu byla pozorována nestabilita aspartamu ve vodě a jeho degradace na jednotlivé produkty. Jelikož se aspartam řadí mezi dipeptidy, skládá se tudíž ze dvou aminokyselin, metylesteru fenylalaninu a kyseliny asparagové spojených amidovou vazbou.[11, 31, 38-40]



Obrázek 8 Závislost náboje aspartamu na pH a jeho izoelektrický bod [11]

Izoelektrický bod má aspartam v pH 5,2. Největší rozpustnosti dosahuje aspartam v bodě jeho minimálního izoelektrického bodu. Při nižších hodnotách pH nese molekula aspartamu kladný náboj a při vyšších hodnotách pH nese negativní náboj. Za normálních teplot (teplota místnosti 22°C) a pH 3,4-5 má aspartam nejlepší stabilitu. Při hodnotách pod 3,4 pH je dipeptid hydrolyzován na jeho odpovídající aminokyseliny, při hodnotách pH vyšších než 5 dochází k intramolekulární cyklizaci a k tvorbě diketopiperazinu (viz Obrázek 9).[11, 31, 32, 38-40]

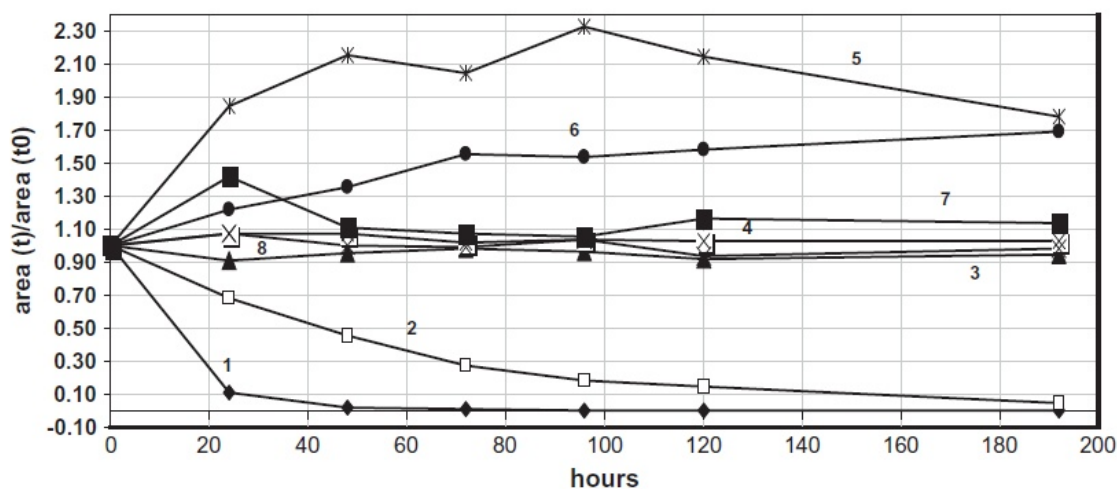


Obrázek 9 Procesy intermolekulární cyklizace v aspartamu ve vodě při $\text{pH} \geq 5$.

1 – aspartam, 2 – diketopiperazin [11]

Při úvaze stability aspartamu je třeba brát v potaz původ surové vody, kdy pH surových vod je mezi 7,7 a 8,5 u jezerních zdrojů, 7 a 9 pro říční zdroje a 6,5 u zdrojů z podzemních vod. Při takovýchto hodnotách pH je rozklad aspartamu směřován na dráhu

cyklizace a tvorbu diketopiperazinu. Při testu stability aspartamu byly vzorky o pH 4,4 a 7,9 uloženy při teplotě místnosti a při 4°C po dobu 8 dní a průběžně měřeny. Z výsledků plyne, že aspartam se rychle rozkládal při teplotě místnosti v případě vyššího pH, při teplotě 4°C nastává rozklad také, ale mnohem pomaleji. Současně také dochází k tvorbě diketopiperazinu, která je téměř konstantní s úbytkem aspartamu. Pokud se ovšem pH přizpůsobí optimálně pro aspartam, pak téměř žádná degradace neprobíhá, bez ohledu na to, o jakou teplotu se jedná.[11, 31, 32, 33, 38-40]

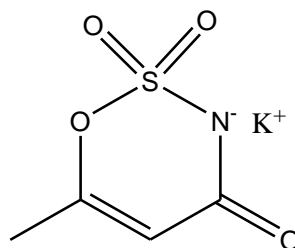


Obrázek 10 Vzorky vody obsahující aspartam s původní hodnotou 7,9 pH a upravenou hodnotou pH na 4,3 při teplotě místnosti a při 4°C a postupný vznik diketopiperazinu. Pokojová teplota - 1, 3, 5, 7, 4°C - 2, 4, 6, 8. ASP 1-4, DKP 5-8, pH 7,9 – 1, 2, 5, 6, pH 4,3 – 3, 4, 7, 8 [11]

V dalších studiích bylo pozorování zaměřeno na stabilitu pevného aspartamu, která je daleko vyšší než po jeho rozpuštění. Uvádí se, že byl zjištěn pouze 5% přírůstek diketopiperazinu po zahřátí na 105°C po dobu 70 hodin. Avšak v některých studiích byla zjištěna citlivost aspartyl- a asparaginyl-glicinu na teplo, a to v sušeném (pevném) stavu. Dle dalších studií se ukazuje, že pevný aspartam není příliš stabilní při teplotách nad 90°C. Při dalších úpravách (lyofilizace) a vakuovém zahřátí na 110°C po dobu 24 h při neutrálním pH byl ve vzorku zaznamenán pomocí HV–elektroforézy (vysoko voltová elektroforéza) produkt elektroforeticky neutrální a fluorescenčně pozitivní, což odpovídá nezahřátému aspartamu, a potvrdily se tedy výsledky starších studií o stabilitě pevného aspartamu.[13, 34, 35]

Aspartam se stal také předmětem studií jeho stability v ovocných nápojích, kdy bylo zjištěno, že jeho stabilita se liší dle jednotlivých závislých jako teplota, čas a pH, kdy molekula aspartamu v kyselé oblasti pH pomalu hydrolyzuje za vzniku aspartylfenylalaninu a metanolu. Další možnou cestou je pH 5 a víc, kdy dochází k tvorbě diketopiperazinu a metanolu. Tyto produkty mohou být dále hydrolyzovány až na své jednotlivé aminokyseliny, kyselinu asparagovou a fenylalanin. Na stabilitu aspartamu v nápojích mohou mít však vliv také látky obsažené v těchto nápojích, ať už se jedná o vliv negativní či pozitivní, které zároveň ovlivňují vnímání sladké chuti či její změnu v průběhu času. Aspartam je postupně degradován na diketopiperazin při skladování za teplot 30-80°C v kapalných vzorcích. Při zvýšených teplotách byla také prokázána jeho reaktivita s cukry přes Maillardovy reakce. Dobrá stabilita byla zjištěna při skladování za pokojové teploty a pH 3-4 a maximální stabilita při pH 4,2. Hydrolytický rozklad aspartamu nastal při pH 3,4 a diketopirazin vznikl při pH nad 5. V obou případech dochází ke ztrátě sladivosti. Při obsahu pufrů je rozklad aspartamu ještě rychlejší. Zároveň bylo zaznamenáno u dehydratovaných výrobků (instantní nápoje), že míra degradace aspartamu je spojena se zvyšující se vodní aktivitou. Jako hlavní faktor ovlivňující stabilitu byla zjištěna teplota, pH a reaktivní látky ovšem také stabilitu výrazně ovlivňují. Aspartam se proto nedoporučuje používat v tekutých produktech s pH vyšším než 7. UHT, vysoké krátkodobé záhřevy jsou šetrné a nedochází k tak výrazným ztrátám (1-3%). Stabilita aspartamu tedy v důsledku ovlivňuje dobu skladovatelnosti na úkor potenciální ztráty sladivosti, a proto je důležitá správná volba matrice výrobku, do kterého je aspartam aplikován.[18, 36, 37]

1.2 Acesulfam draselný



Obrázek 11 Acesulfam draselný

Jedná se o náhradní sladidlo, které je označováno kódem E950. Chemicky se jedná o draselnou sůl 6-metyl-1,2,3-oxothiazin-4 (3*H*)-on 2,2-dioxidu. Jeho sladivost je uváděna přibližně 200x větší než sacharóza a nemá žádné kalorie. Sladidlo má mírně nahořklou příchut'. Doporučený denní příjem by neměl přesáhnout 15 mg/kg tělesné hmotnosti. Jedná se o bílou krystalickou látku. Patří mezi heterocyklické sloučeniny a v potravinářství se využívá jeho draselná sůl.

1.2.1 Historie

Acesulfam-K byl objeven podobně jako dříve zmíněný aspartam, a to v roce 1967 chemikem Karlem Claussem. Všiml si sladké chuti po olíznutí prsů při laboratorní práci. V roce 1978 po studiu této látky Světovou zdravotnickou organizací byl přiřazen obecný název acesulfam. Acesulfam byl schválen k užití v USA roku 1988 pro specifické použití a i jako stolní sladidlo. V roce 1998 ho FDA schválila pro použití v nápojích, kde částečně zaniká jeho trpká pachuť. V roce 2003 byl schválen pro všeobecné užití v potravinách vyjímaje maso a drůbež (FDA 2006). [5, 6]

1.2.2 Použití

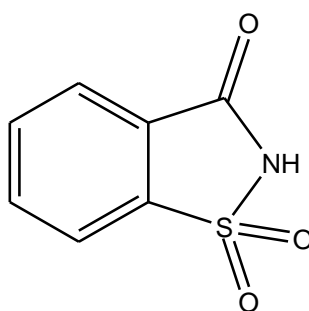
„Použití v potravinách jako je pečivo, nápoje (mléčné nápoje, instantní čaj, instantní káva, suché základy pro směsi, nápoje na ovocné bázi), nealkoholické nápoje (kolové nápoje, citrusové ochucené nápoje), cukerné konzervy a cukrovinky (dia výrobky, polevy, náplně, sirupy), alkoholické nápoje (pivo), ocet, nálevy a omáčky (pomazánky, salátové dresinky, okurky, zálivky), mléčné výrobky (jogurt a výrobky jogurtového typu, dehydrované základy pro pudinky, dezerty a mléčné analogy, mražené krémy bez cukru), výrobky z ovoce, zeleniny a ořechů (ovocné nápoje, ovocné výrobky, ovocné jogurty, dia džemy a marmelády, nízkokalorické záchovky), další (ústní kosmetika, léčiva, žvýkačky, kapalný koncentrát, mražené a chlazené dezerty).“ V potravinách se používá, jako náhradní sladidlo kdy je hodnoceno 200x silněji než sacharóza a zároveň slouží částečně jako modifikátor aroma. Acesulfam-K je snadno rozpustný ve vodě, DMF a DMSO, není hygroskopický. Je také rozpustný v alkoholu. Má výbornou stabilitu při pH 3 a vyšším, a to i při pasteraci, sterilaci a i při pečení nad 200°C. V pevné formě je stabilní po dobu 5 let. Sterilovaný roztok nepodléhá hydrolýze po dobu jednoho měsíce. Dávkování v množství 400-700 mg/l zaručuje průměrnou sladkost nápojů. Chemická a senzorická kompatibilita s cukry je neomezená, nejlepších vlastností se dosahuje v kyselých výrobcích, ale sladkost bývá mírně snížena u horkých nápojů. Bývá použit pro doplnění cukrů v mražených

krémech bez ovlivnění jejich teploty tání a náslehoové schopnosti. Může být použit pro maskování výraznějších pachutí jiných produktů. Používá se jak samostatně tak ve směsích, například při smíchání s thaumatinem se dosahuje podobných sensorických vlastností jako u aspartamu. V kombinaci s ostatními náhradními sladidly je výhodné užívat poměr 1:1, kdy pak sladkost dosahuje dobrých chuťových vjemů zejména při kombinaci s cyklamátem nebo aspartamem. Legislativní limity viz Příloha P 1.[2]

1.2.3 Vlastnosti

Jedná se o bílou krystalickou látku. Používá se ve formě draselné soli. Prášek nevykazuje žádný zápach. Velmi mírná trpká/svíravá chuť je patrná až při vysokých koncentracích. Rychlý nástup jemné sladké chuti. Bod tání je v rozmezí 250-255°C. U tohoto náhradního sladidla jsou stanoveny i maximální obsahy těžkých kovů a arzeny. Rozpustnost ve vodě při 20°C při 31% koncentraci je 360 g/l, při 50°C 830 g/l a při 100°C 1300 g/l. V etanolu o koncentraci 20% je rozpustných 221 g/l při 23°C a v čistém etanolu při 20°C 1g/l. Při rozpouštění nedochází k zhnědnutí. Je málo rozpustný v organických rozpouštědlech, ale rozpustnost stoupá v jejich vodných směsích. Chuťový profil acesulfamu-K je považován za lepší než u sacharinu. Alkoholů, maltolu a ethylmaltolu může být využito pro maskování pachutí. Acesulfam-K může vyvolat alergické reakce kvůli obsahu fenylalaninu.[2]

1.3 Sacharin



Obrázek 12 Sacharin

Je náhradní sladidlo označované kódem E954. Chemicky se jedná o 2,3-dihydroxy-1,2-benzisothiazol-3-on-1,1-dioxid. Je přibližně 500x sladší než sacharóza, ale má nepříjemnou kovovou dochuť, obzvláště při vyšších koncentracích. Denní maximální příjem je 2,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Jeho zdravotní nezávadnost byla dlouho

diskutována kvůli jeho možným karcinogenním účinkům. Dnes je již však odebrán ze seznamu karcinogenních látek.[7]

1.3.1 Historie

Sacharin byl objeven roku 1879 na Univerzitě Johna Hopkinse. Jedná se o nejstarší náhradní sladidlo. Průmyslově se vyrábí z toluenu, ale poprvé byl vyroben z kamenouhelného dehtu. Náhodou došlo k zpozorování sladkého vjemu při krystalizaci jednotlivých frakcí. 1884 byla výroba sacharinu patentována. K jeho rozšíření dopomohl celkový světový nedostatek cukru. I dnes je stále velmi používané náhradní sladidlo. Problémy s jeho zdravotní nezávadností jsou předmětem mnoha publikovaných studií, dle kterých byl předpoklad nárůstu karcinomů u jednogeneračních pokusů a také ojedinělé výskyty dvougeneračních karcinomů při pokusech na krysách. V určitém období byl sacharin zakázán (FDA 1977). Byl nechán přezkoumat a na základě výsledků studií byl opět povolen. Jeho používání však bylo omezeno na určité výrobky, které musely být náležitě označeny štítkem, že sacharin způsoboval rakovinu na testovaných zvířatech. V roce 2001 bylo schváleno, že za normálních podmínek nezpůsobuje rakovinu u „zdravých“ lidí, a výstražný štítek byl označen. Dle výsledků se však nedoporučuje konzumace sacharinu u lidí trpících onemocněním močového měchýře, který se při testech jevil jako rizikový faktor.[7, 8]

1.3.2 Použití

„Použití v potravinách jako je pečivo, ovoce, zelenina a příbuzné výrobky (ovocné nápoje, konzervy), nápoje (káva), nealkoholické nápoje, cukr, cukerné zavařeniny a cukrovinky (stolní sladidla, cukrovinky, zavařeniny, čokoládové výrobky), ocet, nálevy a omáčky (salátové dresinky), ostatní (ústní hygiena, žvýkačky, želatinové dezerty, kakao).“ Je relativně stabilní a levný, používá se ve směsích s jinými produkty, aby byla potlačena jeho nepříjemná pachut', používají se: glukono-d-lakton, glukonát sodný, glykoly, kořen hořce, maltol, pektin, příchut' citrónu, kyselina adipová, aldohexuronová kyselina a kyselina citronová. Byl užíván v poměru 3:1 (cyklamát:sacharin) do nápojů až do zákazu cyklamátů v USA v roce 1969. Poté byly v této směsi cyklamáty nahrazeny chloridem vápenatým v kombinaci s hydrolyzovaným kukuřičným škrobem, laktózou, sacharózou. Díky jeho vysoké stabilitě ho lze užít při smažení, pečení a i ve velmi kyselém prostředí. V kombinaci s jinými sladidly je používán jako stolní sladidlo, v kombinaci se sorbitolem nebo aspartamem je použitelný do žvýkaček a do výrobků pro ústní hygienu. Když je

použit sám o sobě do nápojů, neposkytuje takovou sladkou chuť jako ve směsích s jinými sladidly. Legislativní limity viz Příloha P 1.[2]

1.3.3 Vlastnosti

Je to bílý krystalický prášek. Jedná se o kyselinu, která není rozpustná ve vodě, proto se používají její soli, jako jsou sodná či méně už vápenatá, která je však důležitá pro lidi s dietou na sodík. Jeho sladká chuť je detekovatelná i při naředění 1:100000. Sacharín je nestálý při prudkém ohřevu, ale je stabilní vůči reakcím se složkami potravin. Je termostabilní v rozsahu pH 2-7, nedochází k žádným změnám ani při působení 150°C po dobu 1 hodiny. Při pH 3,3-8 nepodléhá reakcím neenzymatického hnědnutí. V krystalickém stavu jej lze skladovat po dobu několika let při zachování přiměřených podmínek. Je stabilní při běžných operacích ve výrobě nápojů. Dokonalé stability dosahuje v nápojích z ovocných šťáv, kde je snadno rozpustný ve formě solí a je kompatibilní s ostatními přísadami ovocných nápojů. Z organismu je vylučován beze změny. Některé výzkumy poukazují na zvýšený výskyt tumorů močového měchýře u krys krmených sacharín/cyklamátovou směsí. Později bylo potvrzeno, že toto bylo způsobeno sacharínovou složkou směsi. Účinek byl stanoven při velkých dávkách, které konzumují diabetici, neodhalily se však žádná spojení mezi sacharínem a nádory močových měchýřů u lidí, kteří toto sladidlo konzumovali. Podmíněně však může mít karcinogenní účinky, taktéž mírnou akutní toxicitu při zdravotních potížích zatěžující imunitu. Může vyvolat alergické reakce, nevolnost, zvracení a průjem. Je považován za experimentální teratogen s účinky na reprodukci, v některých případech může způsobovat mutace. Při záhřevu na teplotu rozkladu mohou vznikat látky s možnými toxikologickými účinky jako: NO_x a SO_x. [2, 9, 26]

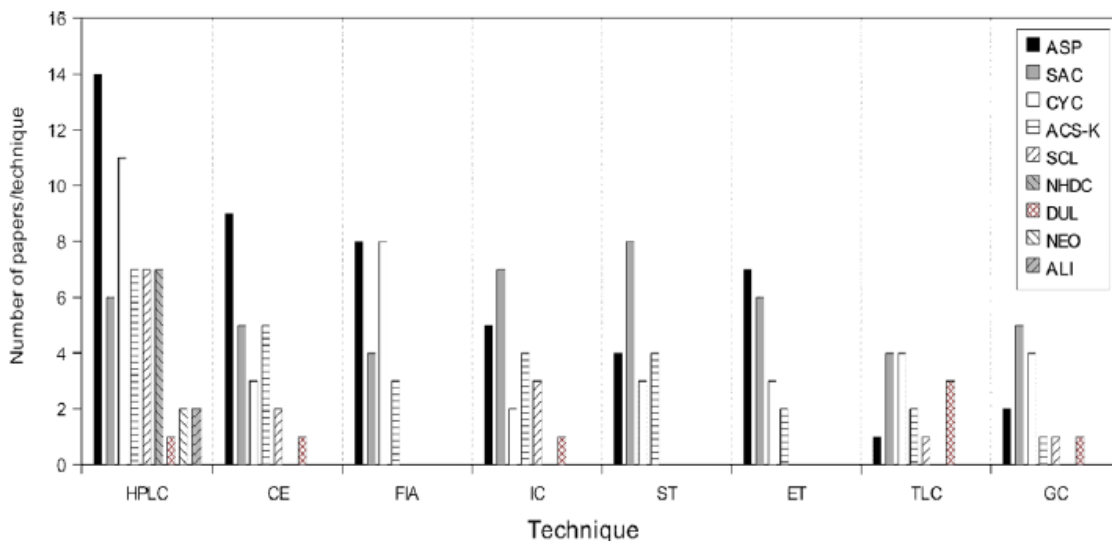
2 MOŽNOSTI STANOVENÍ ASPARTAMU

Pro rychlé a jednoduché stanovení aspartamu a rozdělení jeho degradačních produktů lze velmi efektivně použít HPLC s různými typy detekce, kdy se nejčastěji jeví a používá jako spolehlivá UV detekce při 210 nm za izokratických podmínek a méně často za podmínek gradientové eluce. U aspartamu bývají touto analytickou metodou stanoveny čtyři produkty jeho degradace, jelikož je aspartam relativně nestálý ve vodném prostředí a v závislosti na teplotě. Degradací produkty vznikají cestou hydrolyzy a cyklizace aspartamu, dle podmínek prostředí dochází k různým rovnováhám a koncentracím výsledných produktů.[10]

2.1 Analytické metody stanovení pomocí HPLC

2.1.1 Analytické metody

Metod pro stanovení náhradních sladidel je široká škála a jsou založeny na různých principech, většinou se však jedná o metody vyvinuté jen pro jednotlivá náhradní sladidla. Vývoj metod byl dán tedy sloučeninami, které byly objeveny. Jak vyplývá z Obr. 3, jsou tyto nejstarší sloučeniny stanovitelné všemi analytickými metodami. Vzhledem k používání sladidel ve směsích je třeba vyvinout takové metody, aby bylo možné určit náhradní sladidla v rámci jedné analýzy. Takovýchto publikovaných metod pro stanovení směsí náhradních sladidel je však velmi málo. Z těchto metod je nejčastěji využívána HPLC, díky široké škále separačních kolon a zároveň velkému množství detektorů je HPLC skutečně univerzální technika. Reverzní fáze LC (RP-LC) je známá vyzkoušená technika, která je vhodná pro oddělení náhradních sladidel. Kromě HPLC našly v této oblasti uplatnění také další metody.[12]



Obrázek 13 Použití analytických metod pro stanovení umělých sladidel. CE- kapilární elektroforéza, ET-elektroanalytické techniky, FIA-pomalá injekční analýza, HPLC-vysoce účinná kapalinová chromatografie, IC-iontová chromatografie, GC-plynová chromatografie, TLC- tenkovrstvá chromatografie, ST-spektroskopické techniky [12]

Iontová chromatografie je výhodná použitím bezpečných a levných roztoků solí místo organických rozpouštědel. Kapilární elektroforéza je další technika použitelná pro simultánní stanovení několika sladidel. Pro určení jednoho či dvou sladidel v daném vzorku se používají rychlé, jednoduché, reprodukovatelné analytické metody sestavení na jeden určitý produkt. Tyto rychlé metody jsou publikovány pro acesulfam-K, sacharin, cyklamát a aspartam. Využívají se konkrétní reakce a detekční systémy, což vede k časové nenáročnosti a menší pracnosti, ale zároveň srovnatelné s multi-spektrálními metodami v přesnosti a citlivosti.[12 41-43]

Mezi další postupy založené na izokratickém systému patří RP-LC, které jsou využitelné i s různými systémy detekce jako UV spektrometrie, amperometrie, coulometrie, hmotnostní spektrometrie, spektrofourometrie, rozptyl světla a konduktometrie. Pro stanovení aspartamu byly vypracovány RP-HPLC metody se spektrofotometrickou detekcí (205nm, 214nm a 215nm) a s mobilní fází obsahující fosfátový pufr a acetonitril anebo metanol. Většina z nich byla vyvinuta pro 25 mm kolony, ale aspartam může být oddělen i 30 mm kolonami. Díky tomu je doba analýzy zkrácena pod 10 min, ale selektivita je horší než u 250 mm kolony. Detekce byla

provedena pomocí UV-detektoru. Aspartam a jeho degradační produkty mohou být stanoveny spektrofotometricky pomocí předkolonové derivatizace. Aspartylfenylalanin, kyselina asparagová a fenylalanin reagují s naftalen-2,3-dikarboxylaldehydem v přítomnosti CN^- a v mírně zásaditém prostředí vznikaly vysoce fluorescenční 1kyano-2-substituovanébenz[*f*]isoindolderiváty. Se spektrofotometrickou detekcí je limit detekovatelnosti v pikomolových rozsazích. Hlavní nevýhodou těchto metod je většinou nutnost zdlouhavé derivatizace. Přirozená fluorescence aspartamu může být použita pro detekci v HPLC. Tato metoda nevyžaduje derivatizaci a použití spektrofotometrických detektorů zvyšuje přesnost a citlivost. Aspartam lze také stanovit HPLC s elektrochemickou detekcí. Aspartam je obvykle elektrochemicky neutrální, použitím kolonových fotochemických reaktorů můžeme jednoznačně určit aspartam pomocí elektrochemické detekce. Společná HPLC-UV není vhodná pro stanovení cyklamátů kvůli nedostatku chromoforů v jeho molekule. Tento nedostatek lze odstranit nepřímou UV fotometrií, párovou iontovou extrakcí a předkolonovou derivatizací.[12, 22, 41-43]

Navzdory vysoké použitelnosti a praktičnosti HPLC u jednotlivých sladidel či jejich dvojic, není vypracováno mnoho metod pro stanovení vícesložkových směsí sladidel. Separace a kvantifikace ze sedmi sladidel (aspartam, acesulfam-K, sukralóza, alimát a dulcin) může být dosaženo pomocí kolony C18 pracující v gradientu. K detekci byla použita UV absorbance při 200 nm nebo 210 nm. Nejvíce metod je aplikováno na systém HPLC-UV, ale také kombinace HPLC-MS je velmi efektivní, kdy pomocí této metody lze vedle sebe stanovit až 8 sladidel. Tato metoda nepotřebovala žádné speciální separační kroky, potraviny byly extrahovány směsí metanolu a vody, po filtraci byly injekčně naneseny do HPLC-MS systému. Kvantifikace cílových sloučenin proběhla pomocí selektivní ionizační techniky pro m/z 178, 397, 377, 293, 641, 312, 162 a 182, pro cyklamát, sukralózu, neotam, aspartam, steviosid, alimát, acesulfam-K a sacharin a ještě warfarin jako vnitřní standard ($m/z = 307$).[12, 22, 41-43]

Rozdělování směsí umělých sladidel je možno provést pomocí systému HPLC s TOF/MS analyzátozem. Díky tomuto analyzátoru došlo ke snadné detekci směsi sladidel, která obsahovala aspartam, sukralózu a sacharin, pomocí gradientové eluce přes C_8 kolonu. Směs s aspartamem lze analyzovat pomocí elektrospreje, a to kladné i záporné ionty. Pro lepší fragmentaci se však využívají většinou kladné ionty. Dochází tak k ionizaci molekul aspartamu a ve výsledku je analýza bohatá na jeho stanovitelné fragmenty, které jsou již detailně zanalyzovány a jsou dobře známy jejich molekulární vzorce. Tato metoda

prokazuje vysokou citlivost a selektivitu, která umožňuje jednoznačnou identifikaci vybraných náhradních sladidel i v složitějších komplexních maticích.[20]

Vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí ELSD byla vyvinuta pro stanovení náhradních sladidel ve směsích pro sycené a nesycené nápoje a v konzervovaných výrobcích. Pomocí této metody lze stanovit až 9 náhradních sladidel ve směsích, kdy doposud bylo možné stanovovat analyticky jen směsi se 2 až 4 složkami. Taktéž byl problém s některými složkami směsi, a tudíž byla ovlivněna a stanovena sladidla jako aspartam. V této metodě se pracuje za vyšších teplot (85°C) a detekce byla provedena pod dusíkem. K této práci byly také provedeny výzkumy standardů skladovaných při -70°C a bylo prokázáno, že aspartam při těchto podmínkách nepodléhá degradaci. Ovšem po ověření zkušebních matic bylo zjištěno, že degraduje při 4°C po 7 dnech a při 20°C již po 3 dnech.[21]

2.1.2 Přípravy vzorků potravin

Kvůli variabilitě způsobené různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi potravin musí být vzorky řádně připraveny. Obecně úprava vzorků zahrnuje homogenizace, extrakce, čištění a koncentrační metody. Jednodušší pro analýzu jsou vzorky kapalné oproti vzorkům tuhým, které je nutno po převedení do kapalného stavu minimálně jednou přečistit. Speciální přípravu musí podstoupit vzorky jídel kvůli své speciální matici, některé složky totiž spolu mohou reagovat. Řešením bývá postupná extrakce do různých extrakčních čidel. Složitost takovýchto vzorků může způsobovat množství problémů jako zákal, vznik emulzí a nejproblematictější je maskování analytu a jeho signálu. Tyto problémy obvykle vedou ke zvýšení detekce metody, řešením obvykle bývá dostatečné vyčištění vzorku, jako extrakce přes sloupec s vhodnou stacionární fází, dialýza, extrakce typu kapalina-kapalina, srážení a následná filtrace. Nejdůležitější je maximalizovat výtěžnost analytu a minimalizovat rušení pomocí extrakce a čisticích postupů. Optimální přípravou lze snížit čas analýzy, odstranit chyby, zlepšit citlivost a identifikaci, zlepšit stanovení koncentrace analytu. Mezi metody, které nevyžadují přípravu vzorku čištěním a extrakcí, patří základní spektrochemické metody elektrochemické a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), kdy největší výhodou jsou rychlost a eliminace fyzikálně-chemické manipulace se vzorkem. Nevýhodou těchto metod je problematika kalibrace kvůli definicím matic vzorků a u elektrochemických metod nestálost snímače a jeho nutná častá recalibrace. Jednoduché vzorky jako stolní sladidla,

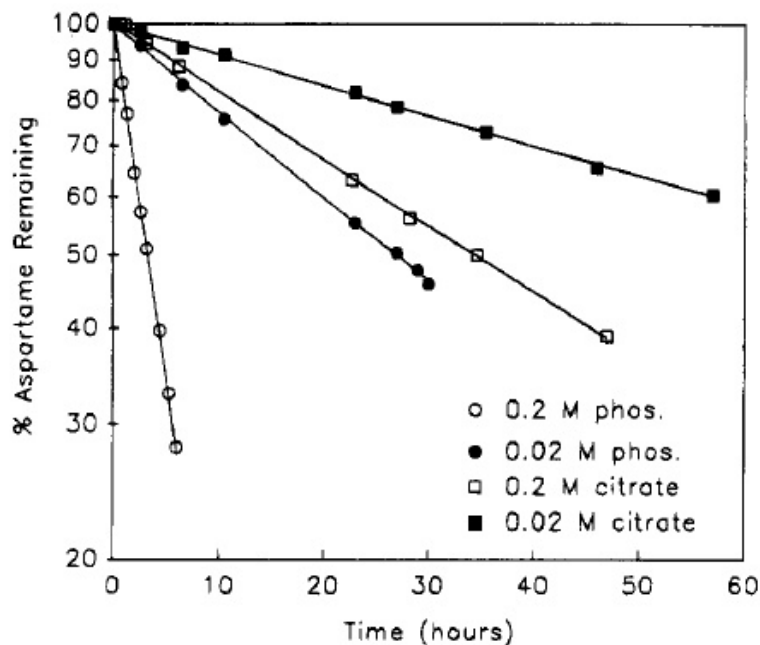
nápoje lze ředit nebo rozpustit v deionizované vodě, vhodném pufru nebo ve směsi s etanolem či metanolem. V případě sycených nápojů musí dojít k jejich odplynění, například ultrazvukem. K čiření lze využít roztoky dle Carreze, $ZnSO_4/NaOH$ a jiné, sloužící k odstranění proteinů, suspendovaných částic či mastných látek. Všechny vzorky jsou před svou analýzou filtrovány, většinou je dostačující jedna filtrace přes membránový filtr. U některých extraktů je nutné odstředění nebo přefiltrování přes papírový filtr. Tato úprava vzorků je obsažena téměř u všech metodik a jedná se o levnou, rychlou a jednoduchou metodu. Někdy musí být využity specializovanější techniky přípravy vzorků jako například frakcionace na pevné fázi při extrakci (SPE) na základě různých afinit sloučenin či jejich skupin na stacionární fázi (obdoba LC). Obvykle zahrnuje operace: přípravu patrony, nabrání vzorku, promývání kazety a eluce analytu. Dále je alikvotní část vzorku nanášena do stabilizované SPE. Typ SPE, rozpouštědla, pH a průtoky musí být přidány vhodně, aby se analyty udržely přechodně v kazetě. Interferující látky musí být zachovány úplně anebo dokonale odstraněny z kazety během nanášení vzorku či promývání kazety. Analyty jsou v eluční části eluovány a látky s vysokou afinitou k sorbentu zůstanou v kazetě. Spojením dialýzy a SPE získáme techniku pro přípravu vzorků sukralózy, aspartamu, neotamu a alitamu. Tyto metody jsou jednoduché, reprodukovatelné a docela rychlé, levné a důležitá je jejich univerzálnost a kompatibilita s technikami používanými při analýze potravin. Existuje mnoho dalších postupů příprav vzorků, ale jsou již velmi specifické pro daný typ analytu, vzorku nebo požitého stanovení.[12, 22]

2.2 Vliv pH na degradaci aspartamu

Pufry jsou vyrovnávací/tlumičí roztoky pro podmínky pH. Vyskytují se v různých dietních nápojích. Nejčastěji používané pufry pro aspartam jsou fosfátové a citrátové pufry.[14]

Pufry byly zkoušeny pro pH 3 a 7 v koncentracích 0,01-1,00 mol/l, za teploty 25°C. Opět se prokazuje, že míra degradace při pH 3 je menší než při pH 7, přičemž rychlost degradace byla zvýšená u fosfátového pufru proti citrátovému, a to hlavně u pH 7. Při pH 3 byl rozdíl v rychlosti degradace mezi jednotlivými pufry již velmi malý. Závislost na pH z pozorované rychlostní konstanty je ukazatelem acido-bazicky katalizované reakce a je

indikována přítomností vodíkových a hydroxidových iontů, pro acido-bazicky katalizovanou degradaci



Obrázek 14 Záznam rozkladu aspartamu ovlivněný pufrů dle druhu a koncentrace při pH 7 a 25°C [14]

aspartamu může být vyjádřena rychlostní konstantou k_{obs} , která je vyjádřena v obecné rovině jako $k_{obs} = k_0 + k_H[H^+] + k_{OH}[OH^-] + k_{BH}[BH] + k_B[B^-]$, kde k_0 je rychlostní konstanta pro nekatalyzované, k_H je rychlostní konstanta pro katalýzu zprostředkovanou vodíkovými ionty, k_{OH} je rychlostní konstanta katalýzy zprostředkované hydroxidovými ionty, k_{BH} je rychlostní konstanta pufru v kyselé katalýze a k_B je rychlostní konstanta pufru v zásadité analýze; $[H^+]$, $[OH^-]$, $[BH]$ a $[B^-]$ jsou koncentrace iontů vodíkových, hydroxidových, protonovaných pufrů a neprotonovaných pufrů (Alberty 1987). Každá z rychlostních konstant může být dále dělena na specifické komponenty pro každou degradační dráhu aspartamu v závislosti na pH. Například při pH nižším než 5,2 má k_H čtyři složky představující konverzi aspartamu na diketopiperazin, aspartylfenylalanin, metylester fenylalaninu a β -aspartam za současného uvolňování metanolu. Jak vyplývá z měření (Tabulka 2), není koncentrace pufrů zanedbatelný faktor, v obou pufrách se zvyšováním koncentrace také rostla degradační rychlostní konstanta, avšak jak je vidět

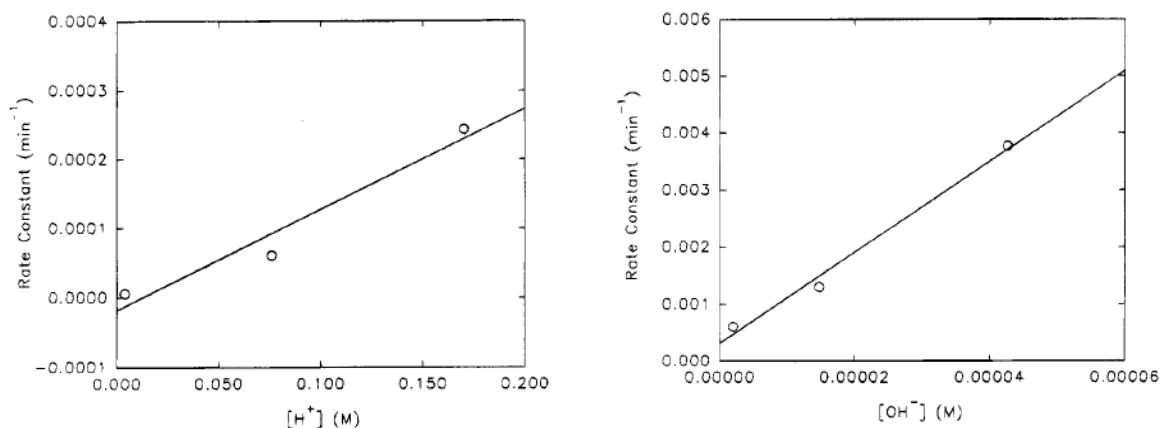
z Tabulky 3, dosahovaly při stejných koncentracích fosforečné pufrů vyšších konstant, a tudíž i vyšší degradační účinnosti na aspartam než citrátové pufrů.[14]

Tabulka 3 Vliv koncentrací, typů a pH pufrů na rychlost degradace aspartamu při 25°C

[14]

c (mmol/l)	pH 7		pH 3	
	fosforečnan (h^{-1})	citrát (h^{-1})	fosforečnan (dny^{-1})	citrát (dny^{-1})
10	14,2±0,3	5,4±0,2	nebyla stanovena	nebyla stanovena
20	25,5±0,6	9,0±0,3	5,0±0,7	4,6±0,7
50	55,5±3,0	12,3±0,9	6,5±0,7	5,5±0,6
100	116,7±6,9	16,3±0,6	8,9±1,1	6,3±1,0
200	211,1±2,8	20,2±0,4	12,4±0,9	9,3±1,2
500	495±8,7	27,0±0,6	19,2±1,7	15,1±1,5
1000	730,9±16,8	27,8±1,3	nebyla stanovena	nebyla stanovena

Při pH 7 se rychlost degradace výrazně zvýší s koncentrací pufru oproti pH 3 v citrátovém pufru, kdy byla degradace v závislosti na koncentraci pufru mnohem méně razantní. Pro ověření rychlostních konstant byla provedena měření ve zředěné HCl a ve zředěném KOH.[14]



Obrázek 15 Rychlostní konstanty degradace aspartamu v závislosti na koncentraci vodíkových iontů (vlevo) a hydroxylových iontů (vpravo) při 25°C [14]

Z měření vyplývá, že pufrů zvyšují degradační účinek na aspartam, zároveň ukazuje na rozdílnou stabilitu v různých druzích pufrů dle jejich schopnosti přenosu protonů, která způsobuje vlastní degradaci aspartamu, kdy dochází k nukleofilnímu atakování karbonylu na volném aminu. V tom tkví i reaktivita jednotlivých pufrů kdy,

v citrátovém není umožněno zároveň darovat i přijmout proton jako u fosfátového, což vede ke zpomalení degradace aspartamu.[14]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Proveďte experimenty, ve kterých bude sledován úbytek aspartamu v závislosti na teplotě a pH prostředí. Proveďte také časovou závislosti výše zmíněných faktorů. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Popis experimentu

Při experimentu A bylo sledováno, zdali dochází k rozpadu aspartamu, a zároveň byly identifikovány některé produkty rozkládajícího se aspartamu: aspartylfenylalanin a diketopiperazin, které tvořily nejvýznamnější podíl z degradačních produktů. Byly měřeny vzorky aspartamu podrobené působení pH 7, 8 a 9 po dobu 4 hodin za laboratorní teploty ($25\pm 1^\circ\text{C}$). Tyto vzorky byly ponechány za laboratorní teploty volně stát a v daných časových intervalech byly nanášeny na kolonu a pomocí UV detektoru byly analyzovány jednotlivé složky ve vzorku.

Při experimentu B po aplikaci předchozích získaných výsledků z experimentu A byly měřeny vzorky aspartamu podrobené působení pH 2, 4, 6 a 8, aby byly zastoupeny všechny oblasti pH, měřeno bylo po dobu 12 hodin za laboratorní teploty ($20\pm 1^\circ\text{C}$). Dále byla také analyzována termolabilita aspartamu, a to i v jaké míře je ovlivňována pH. Teplotní závislost byla sledována u teplot 40, 50, 60, 70, 80, 90°C a u varu vody. Byl sledován trend rozpadu aspartamu jak v čase, tak po teplotním ošetření a také byla provedena identifikace degradačních produktů fenylalaninu, aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu. Při této analýze bylo pracováno se zásobním roztokem aspartamu o koncentraci 3 mg/ml, který byl ředěn na pracovní roztok aspartamu o koncentraci 0,3 mg/ml. Pro teplotní závislost byly připraveny roztoky aspartamu ještě 10x ředěné na koncentraci 0,03mg/ml. Termické závislosti byly sledovány pro zhodnocení okamžitých účinků teplotního záhřevu na degradaci aspartamu. Zásobní roztok směsi fenylalaninu, aspartylfenylalaninu, diketopiperazinu a aspartamu byl připraven v koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4, 0,5 mg/ml a také ještě 10x ředěn pro teplotní závislost aspartamu na koncentrace 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04, 0,05 mg/ml pro měření kalibrační křivky, která byla použita pro přepočítání koncentrací a identifikaci jednotlivých produktů.

4.2 Experiment A

4.2.1 Chemikálie

Pro experiment A byly použity tyto chemikálie:

- acetonitril CHROMASOLV gradient grade pro HPLC, 99%, dodavatel Sigma Aldrich
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a., dodavatel Penta
- kyselina fosforečná p.a., dodavatel Vitrum
- destilovaná voda připravená reverzní osmózou Aqua Osmotic 02
- hydroxid draselný p.a., dodavatel Vitrum, výrobce Lachner
- standard aspartam Nutrasweet (viz Příloha P2)
- vzorek aspartam (N-(L- α -aspartyl)-L-fenylalanin-1-metylester), 98,2%, dodavatel Fluka – BioChemika
- standard diketopiperazin ((2S-cis)-5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazinoctová kyselina), 97%, dodavatel Sigma Aldrich
- standard aspartyl-fenylalaninu, 96%, dodavatel Sigma Aldrich

4.2.2 Pomůcky a přístroje

Pro experiment A byla použita technika a vybavení:

- analytické váhy AND, typ GR-200
- lednice Calex
- ultrazvuková lázeň UCC 4
- kolona Kromasil 100 C18, 7 \square m, 150 x 4,6 mm, s předkolonou SecurityGuard
- sestava HPLC od firmy ECOM Praha s UV detektorem
- izokratické čerpadlo LCP 4100
- spektrofotometrický detektor LCD 2084
- dávkovací ventil analytický smyčkový ECOM typ D, objem 20 μ l
- injekční stříkačka
- filtrační aparatura SUPELCO
- membránový filtr Nylon 66, 0,45 μ m, průměr 47 mm
- nylonový filtr na stříkačku SUPELCO – nylon, 0,45 \square m
- pH metr KNICK , typ 766 Calimatic
- standardní laboratorní sklo a pomůcky

4.3 Experiment B

4.3.1 Chemikálie

- Pro analýzu B byly použity tyto chemikálie:
- acetonitril gradient grade pro HPLC, 99,9%, dodavatel Sigma Aldrich
- dihydrogenfosforečnan draselný p.a., dodavatel Ing. Petr Lukeš
- kyselina fosforečná p.a., dodavatel Ing. Petr Lukeš
- destilovaná voda připravena v Aquamax – ultra 370 series
- aspartam Nutrasweet (fine granular)
- standard aspartam (N-(L- α -aspartyl)-L-fenylalanin-1-metylester), 98,2%, dodavatel Fluka – BioChemika
- standard diketopiperazin ((2S-cis)-5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazinoctová kyselina), 97%, dodavatel Sigma Aldrich
- standard aspartylfenylalaninu, 96%, dodavatel Sigma Aldrich
- standard L – fenylalanin $\geq 99\%$, dodavatel Sigma Aldrich
- dusík N5 99,99%, dodavatel LindeGas a.s.
- NaOH 0,1M
- HCL 0,1 M

4.3.2 Pomůcky a přístroje

Pro experiment B byla použita technika a vybavení:

analytické váhy GR Series - 200

lednice Whirpool

ultrazvuková lázeň Kraintek 2

kolona Cogent HPLC Columns, C18 – 5 μm , 120 A, 150 mm x 4,6 mm s předkolonou SecurityGuard

sestava HPLC od firmy Shimadzu LC – 20AD s UV detektorem Shimadzu UV – VIS SPD – 20AV

dávkovací autosampler Shimadzu SIL – 20AC

injekční stříkačka

nylonový filtr na stříkačku nylon, 0,45 μm

pH metr Eutech instruments pH 510

standardní laboratorní sklo a pomůcky

4.4 Popis přípravy a měření

Separace byla provedena mobilní fází (ACN+fosfátový pufr) při průtokové rychlosti 1ml/min za ustáleného tlaku. Po ustálení chromatografických podmínek (stabilní základní linie) bylo dávkováno 2 x 10 μ l (0,1 mg/ml) roztoku aspartamu a byly zaznamenány plochy a retenční časy píku. Stejně tak byly dávkovány i zbývající standardy fenylalaninu, diketopiperazinu, aspartylfenylalaninu a nakonec i jejich směs. Stejně bylo postupováno se vzorky aspartamu, které měly upravené pH prostředí. Tato závislost degradace aspartamu na pH byla sledována po dobu 12 hodin a vyhodnocena.

4.4.1 Chromatografické podmínky pro stanovení a separaci produktů v závislosti na pH a teplotě

4.4.1.1 Experiment A

Byla použita technika pro reverzní fázi s izokratickou elucí. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril – pufr v poměru 23:77, pufráční roztok byl fosforečné povahy (0,0125 mol.l⁻¹ roztok KH₂PO₄) a upraven na pH 3,5 (pomocí 0,05 mol.l⁻¹H₃PO₄). Jako stacionární fáze byl použit 7 μ m silikagelová báze v koloně Kromasil 100 C18 HPLC (150 x 4,6 mm) s předkolonou SecurityGuard. Teplota v průběhu celé analýzy byla 25 \pm 1°C. Doba analýzy byla nastavena na 6 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml za minutu a měřena při vlnové délce 210 nm.

4.4.1.2 Příprava standardů a roztoků pro experiment A

Standard aspartamu (Nutrasweet) byl rozpuštěn v destilované vodě na ultrazvukové lázni za laboratorní teploty o koncentraci 1 mg/ml do 100 ml odměrné baňky a následně ředěn jako pracovní roztok na 0,1 mg/ml. Stejným postupem byly připraveny také standardy diketopiperazinu a aspartylfenylalaninu o koncentraci 0,2 mg/ml a pracovní roztoky o koncentraci 0,02 mg/ml. Standardy byly před nástřikem přefiltrovány přes nylonový filtr.

Fosfátový pufr byl připraven o koncentraci 0,0125 mol/l o pH 3,5. Navážka byla spočtena na $m = 3,402$ g a navážena na analytických vahách (kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 2 l a doplněna po rysku destilovanou vodou). Úprava pH byla provedena roztokem kyseliny fosforečné (2 mol/l) na pH 3,5.

Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a 0,0125 mol/l fosfátovým pufrem o pH 3,5 (23:77). Byla přefiltrována na filtrační aparatuře SUPELCO a odplyněna v ultrazvukové lázni.

Standard aspartamu byl podroben analýze při pH 7, 8 a 9 za normální laboratorní teploty (25°C) s intervaly měření v řádu 30 min po dobu 4 hodin. Prostředí pH ve vzorcích bylo upraveno pomocí 2 mol/l KOH. Standardy byly přefiltrovány přes membránový filtr pomocí stříkačky a injekčně aplikovány na kolonu pomocí vícecestného ventilu s 20 μ l smyčkou. Detektor byl nastaven na 210 nm s průtokem 1ml/min za stálého tlaku. Vzorek byl vždy dávkován dvakrát za sebou.

4.4.1.3 Experiment B

Byla použita technika pro reverzní fázi s izokratickou elucí. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril – pufr v poměru 15:85, pufrační roztok byl fosforečné povahy (0,0125 mol.l⁻¹ roztok KH₂PO₄) a upraven na pH 3,5 (pomocí 0,1 mol.l⁻¹H₃PO₄). Jako stacionární fáze byl použit 5 μ m oxid křemičitý v koloně Cogent Columns C18 HPLC (150 x 4,6 mm) s předkolonou. Teplota v autosampleru byla 20 \pm 1°C. Doba analýzy byla nastavena na 12 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml za minutu a měřena při vlnové délce 210 nm.

4.4.1.4 Příprava standardů a roztoků pro experiment B

Standard aspartamu, diketopiperazinu, aspartylfenylalaninu a fenylalaninu byl připraven rozpuštěním v destilované vodě na ultrazvukové lázni, o koncentraci 1 mg/ml jako zásobní roztoky, které byly dále ředěny na pracovní koncentraci 0,1 mg/ml. Před měřením byly standardy pomocí injekční stříkačky přefiltrovány přes nylonový filtr (0,45 μ m).

Zásobní roztok aspartamu pro vlastní analýzu byl připraven o koncentraci 3 mg/ml a dále ředěn na pracovní koncentraci 0,3 a 0,03 mg/ml. Před měřením byl pomocí injekční stříkačky přefiltrován přes nylonový filtr (0,45 μ m).

Fosfátový pufr byl připraven o koncentraci 0,0125 mol/l o pH 3,5. Navážka byla spočtena na $m = 1,7$ g a navážena na analytických vahách (kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněna po rysku destilovanou vodou). Úprava pH byla provedena roztokem kyseliny fosforečné (1:2) na pH 3,5.

Mobilní fáze byly zkoušeny v poměrech 23:77, 20:80, 15:85, 5:95 (acetonitril:voda). Nejlepšího dělení bylo dosaženo s mobilní fází o poměru 15:85 a průtoku 1 ml/min. Mobilní fáze byla odplyněna probuláním dusíkem a na ultrazvukové lázni (časy odplynění se přizpůsobovaly připravovanému objemu).

Kalibrační řada standardů (ve směsi) byla připravena navážením jednotlivých standardů s přesností 0,0001 g. Poté byly všechny navážky převedeny do 10 ml odměrné baňky, rozpuštěny na ultrazvukové lázni a odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou. Byl získán roztok o koncentraci 1 mg/ml. Před měřením byl pomocí injekční stříkačky přefiltrován přes nylonový filtr (0,45 μm). Z tohoto zásobního roztoku byly pipetovány objemy 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 ml do vialek a doplněny do 2 ml. Vzniklé roztoky měly koncentrace 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 a 0,50 mg/ml. Stejným způsobem byla připravena kalibrační řada s 10x nižší koncentrací. Vialky byly popsány a uzavřeny teflonovým víčkem. Chromatografická analýza probíhala stejně jako u stanovení standardů, viz výše.

Pracovní roztoky aspartamu o koncentraci 0,3 mg/ml byly upraveny na pH 2, 4, 6, a 8 a byly analyzovány po dobu 12 hodin. Stejně byly upraveny i roztoky aspartamu o koncentraci 0,03 mg/ml a byly podrobeny 10 minutovému účinku teplot 40, 50, 60, 70, 80, 90°C a bodu varu vody a byl změřen okamžitý stav vzorku po tomto teplotním zákroku.

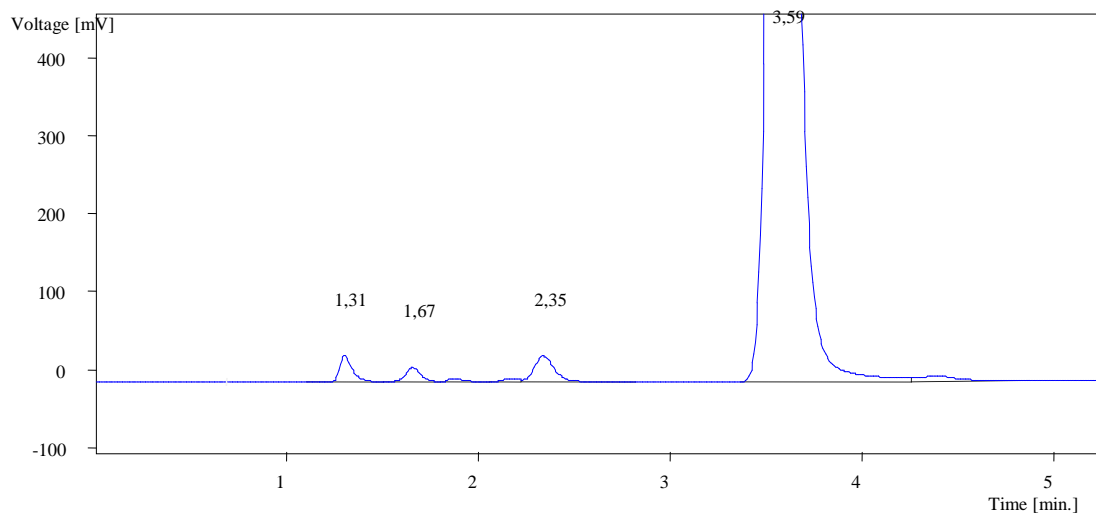
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky pilotního pokusu stanovení aspartamu a jeho degradačních produktů v závislosti na pH (experiment A)

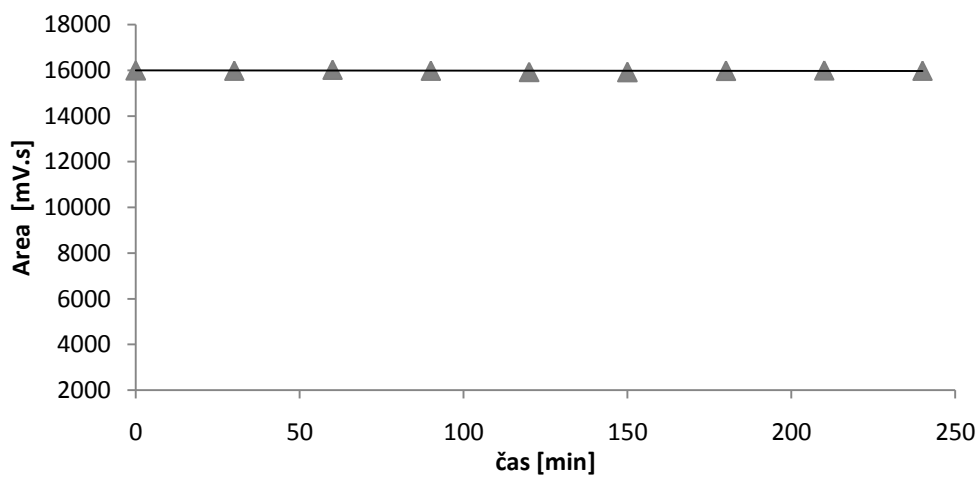
V pilotním pokusu (Experiment A) byly pozorovány závislosti obsahu aspartamu na pH i času, zdali dochází k úbytku aspartamu a zároveň vůči tomu k nárůstu jeho degradačních produktů aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu (Obrázek 17-21). Z měření byla zaznamenána data, která byla graficky zpracována. Ve výsledcích není obsažen standard fenylalaninu.

Při pH 7 nebyl pozorován zjistiitelný rozklad aspartamu, ale i tak došlo ke vzniku degradačních produktů. Jejich tvorba však nebyla nijak výrazná s přihlédnutím k obsahu aspartamu a předpokladu, že při neutrálním pH by mělo již docházet k výraznější tvorbě diketopiperazinu. Zatímco při pH 8 byl již rozklad aspartamu znatelný a tvorba degradačních produktů aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu teoreticky odpovídala úbytku aspartamu. Při pH 9 již byl zaznamenán intenzivní rozklad aspartamu a současný nárůst degradačních produktů, v menší míře to byl aspartylfenylalanin, avšak významnější byl nárůst diketopiperazinu, který je favorizován pro tvorbu v alkalickém pH díky cyklizaci aspartamu.

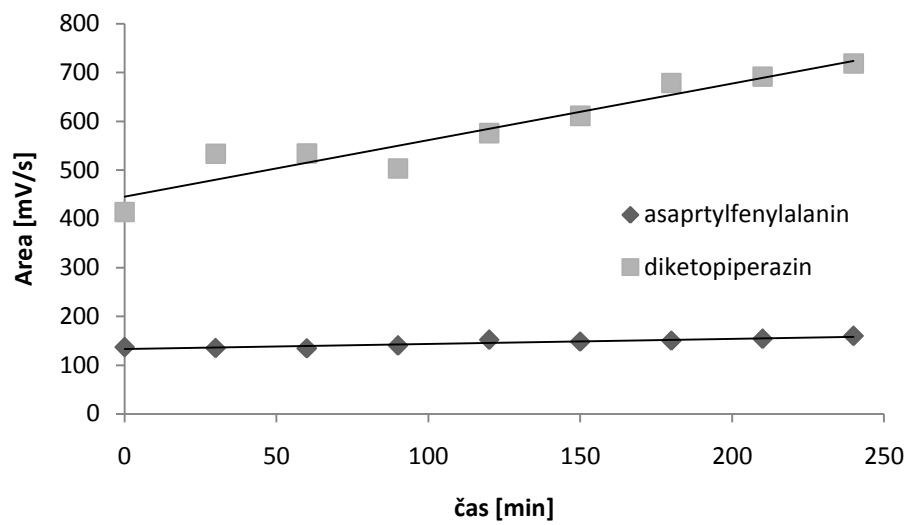
Z pozdějších měření (po 7 a 14 dnech) bylo zjištěno, že diketopiperazin stále dominoval jako degradační produkt, ale koncentrace aspartylfenylalaninu začala narůstat zřejmě díky zpomalujícímu se tempu tvorby diketopiperazinu, a jak bylo již dříve zjištěno v jiných studiích, dochází k postupnému vyrovnávání obou degradačních produktů a také k pozvolnému rozpadu diketopiperazinu. Byl potvrzen předpoklad z dříve citovaných prací, že alkalické pH má značný destrukční efekt na aspartam, a to již řádově v hodinách. Je však nutno brát v potaz, že již při rozpuštění obsahuje aspartam stopy degradačních produktů diketopiperazinu, aspartylfenylalaninu a fenylalaninu (viz Obrázek 16).



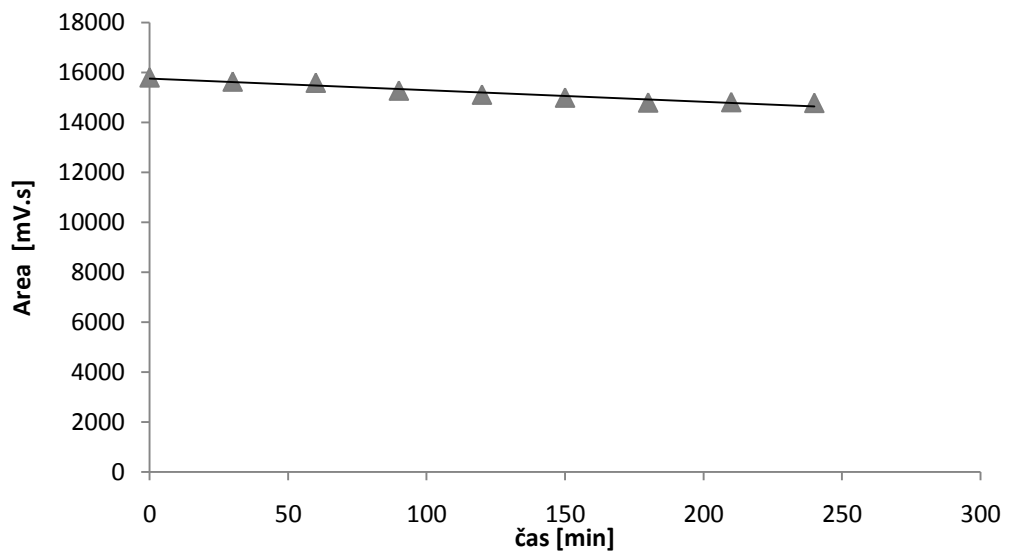
Obrázek 16 Aspartamu (Nutrasweet) o koncentraci 0,1 mg/ml. Kde dle retenčních časů 1,67 aspartylfenylalanin, 2,35 diketopiperazin a 3,59 aspartam (1,31 předpoklad fenylalaninu)



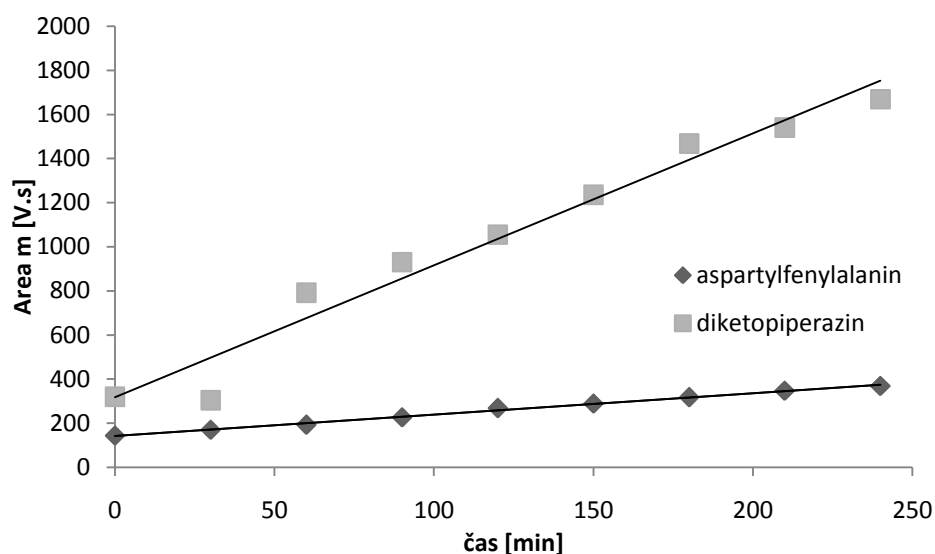
Obrázek 17 Změna obsahu aspartamu za pH 7 při teplotě 25°C ve vodném prostředí



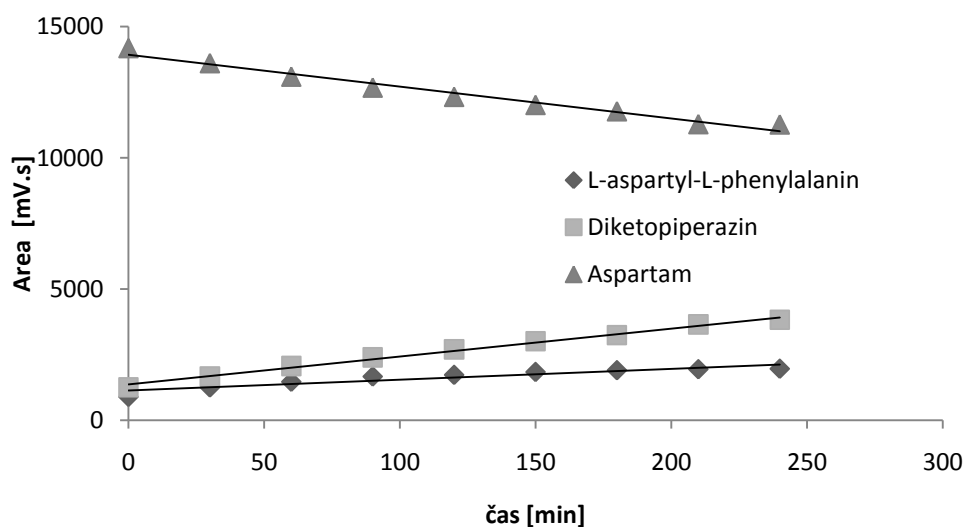
Obrázek 18 Vznik degradačních produktů při pH 7 a 25°C ve vodném prostředí



Obrázek 19 Změna obsahu aspartamu za pH 8 při teplotě 25°C ve vodném prostředí



Obrázek 20 Vznik degradačních produktů při pH 8 a 25°C ve vodném prostředí



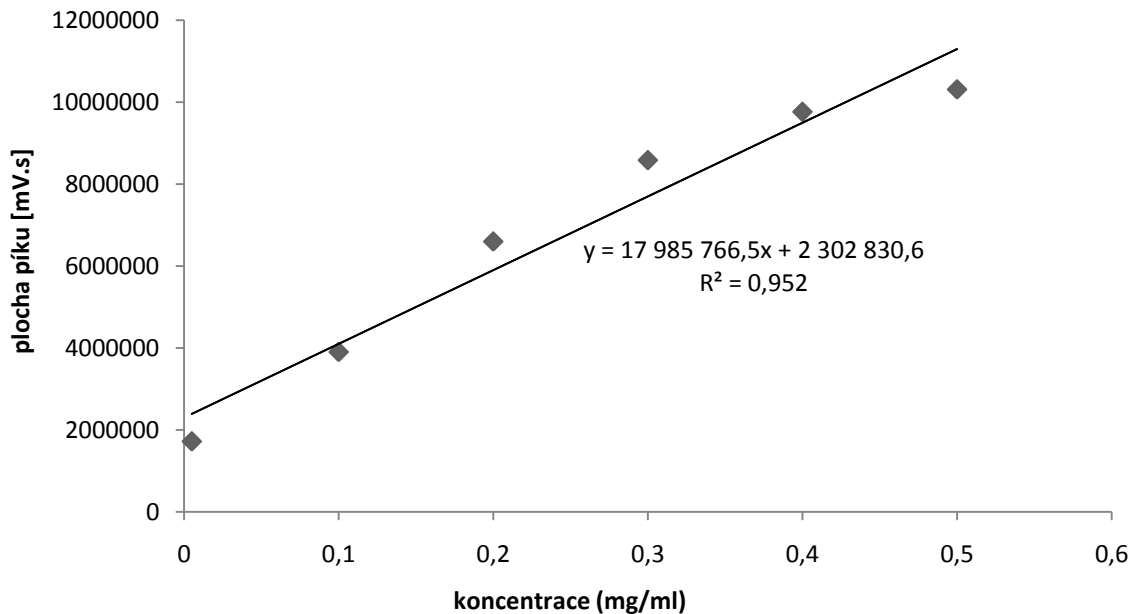
Obrázek 21 Změna obsahu aspartamu za pH 9 při teplotě 25°C ve vodném prostředí a vznik jeho degradačních produktů

5.2 Experiment B

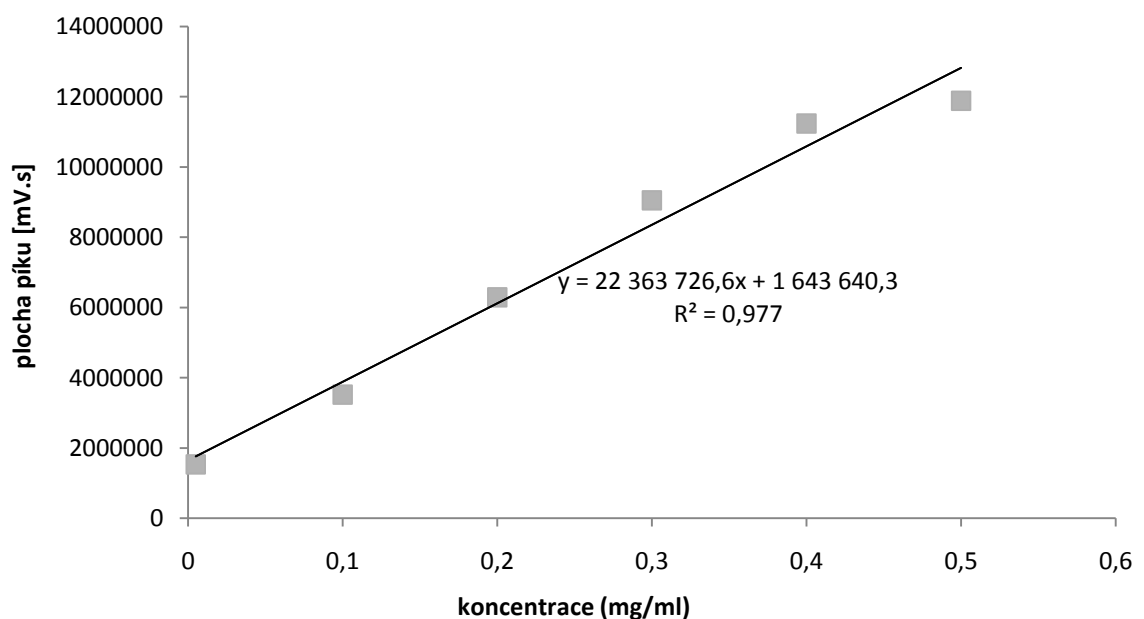
5.2.1 Výsledky měření z kalibrační křivky

Byly proměřeny koncentrace aspartamu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/ml. Každá koncentrace byla proměřena třikrát, detekce byla provedena při vlnové délce 210 nm. Kalibrační křivka byla sestavena z plochy píků A [mV.s] a příslušných koncentrací

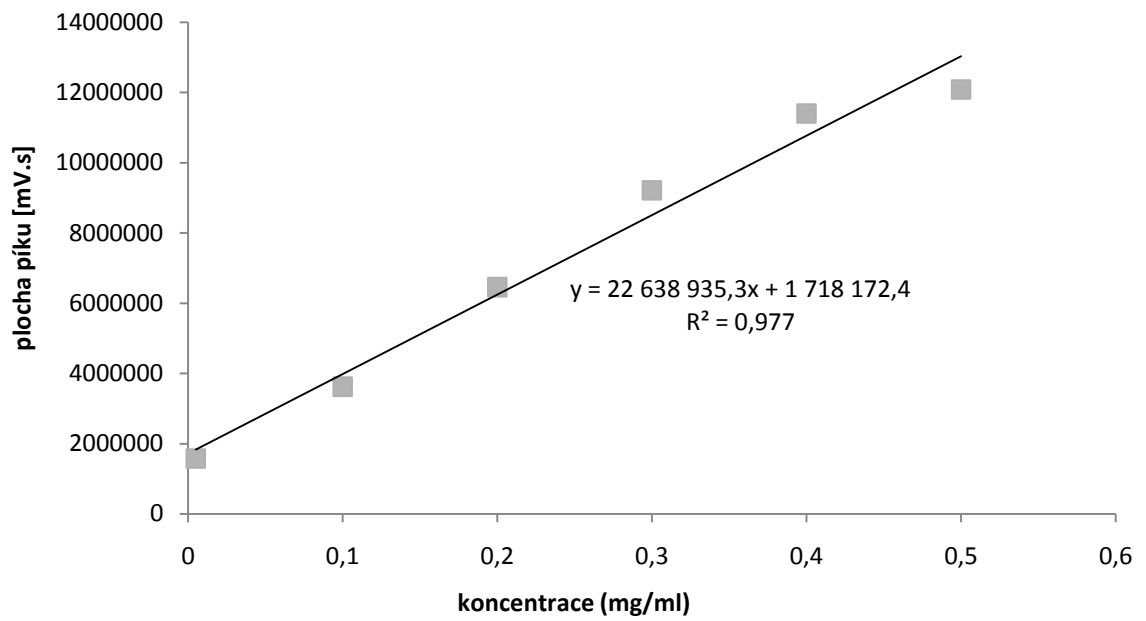
standardů [mg/ml]. Retenční časy byly pro fenylalanin 2,49 min, pro aspartylfenylalanin 3,01 min, pro diketopiperazin 4,65 a pro aspartam 9,40 min. Byly sestrojeny kalibrační křivky pro standardy fenylalaninu, aspartylfenylalaninu, diketopiperazinu a aspartamu, které lze vidět na obrázku 22-25.



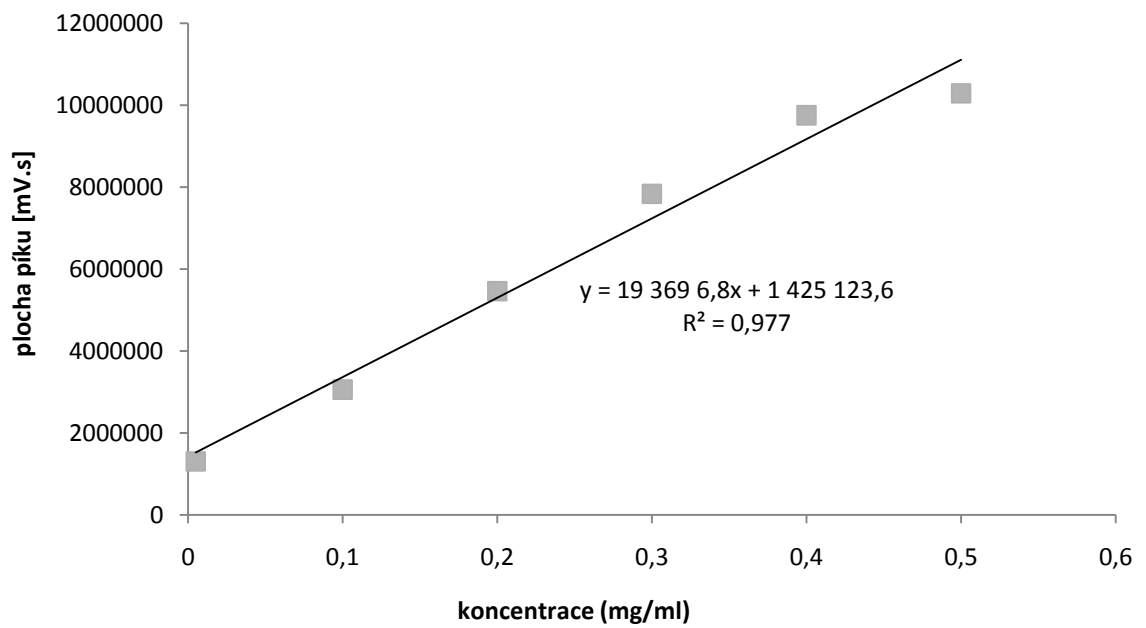
Obrázek 22 Kalibrační křivka standardu fenylalaninu



Obrázek 23 Kalibrační křivka standardu aspartylfenylalaninu



Obrázek 24 Kalibrační křivka standardu diketopiperazinu

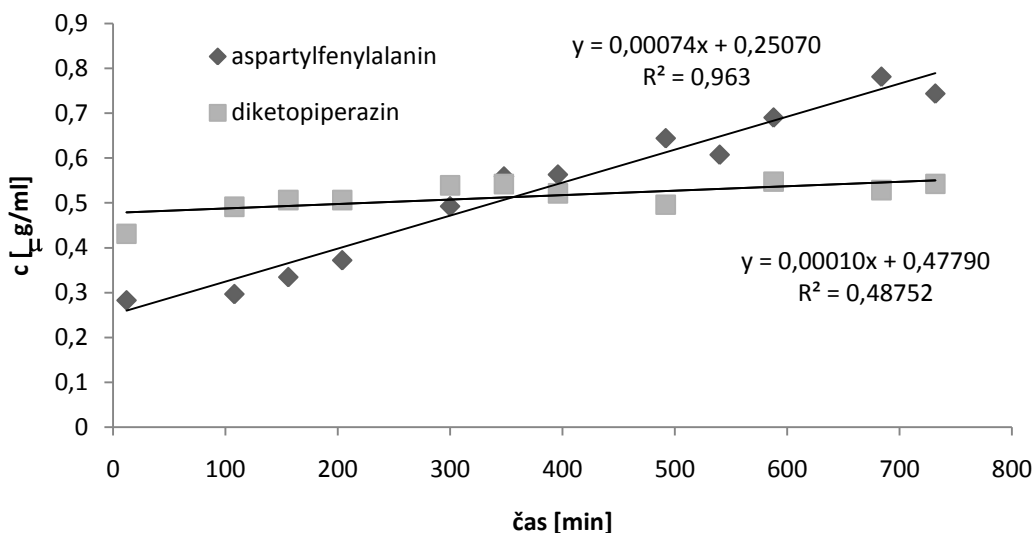


Obrázek 25 Kalibrační křivka aspartamu

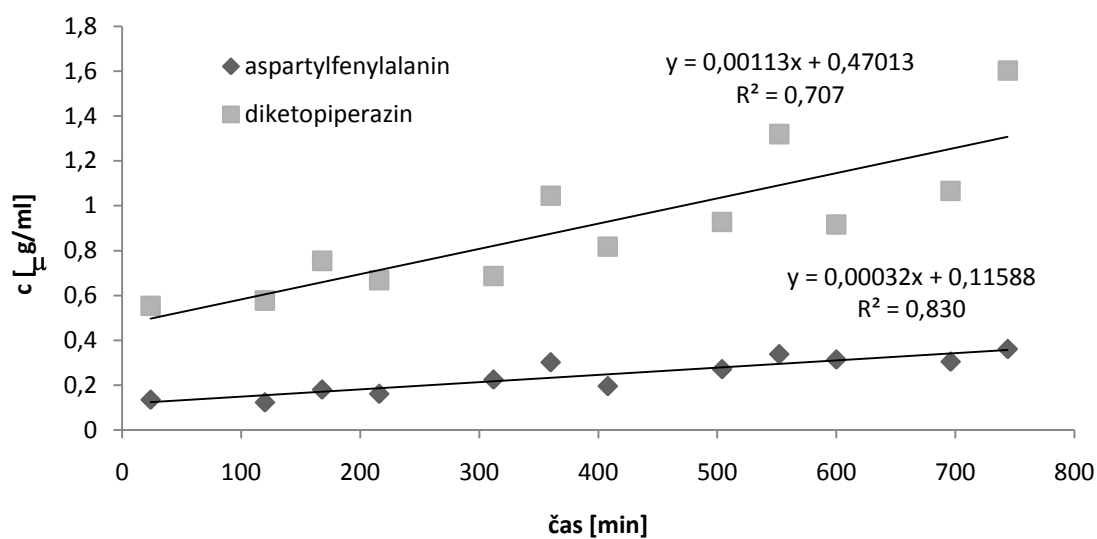
5.2.2 Výsledky stanovení míry degradace aspartamu na vnějších podmínkách (Experiment B)

5.2.2.1 Závislost míry degradace aspartamu na pH a čase

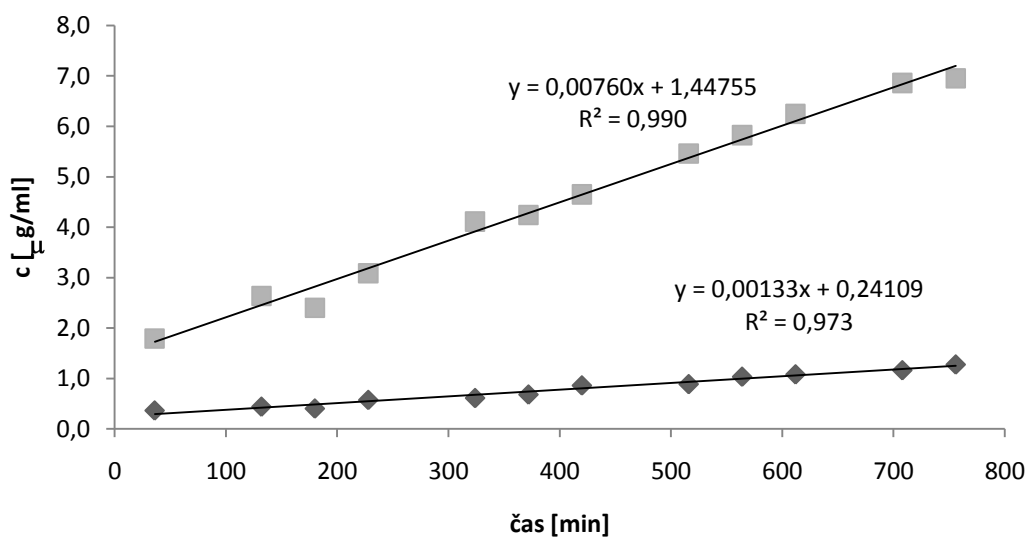
Při provedení druhého experimentu (B) na sestavě HPLC od Shimadzu byla naměřená data přepočtena pomocí kalibračních křivek (viz Obrázek 26 - 29). Dosazením do příslušných rovnic byl zjištěn obsah jednotlivých standardů ve vzorcích. K identifikaci degradačních produktů byly použity retenční časy standardů ve směsi, pro simulaci stejných podmínek. Vzorky byly podrobeny dvanáctihodinovému působení prostředí s pH 2, 4, 6, 8.



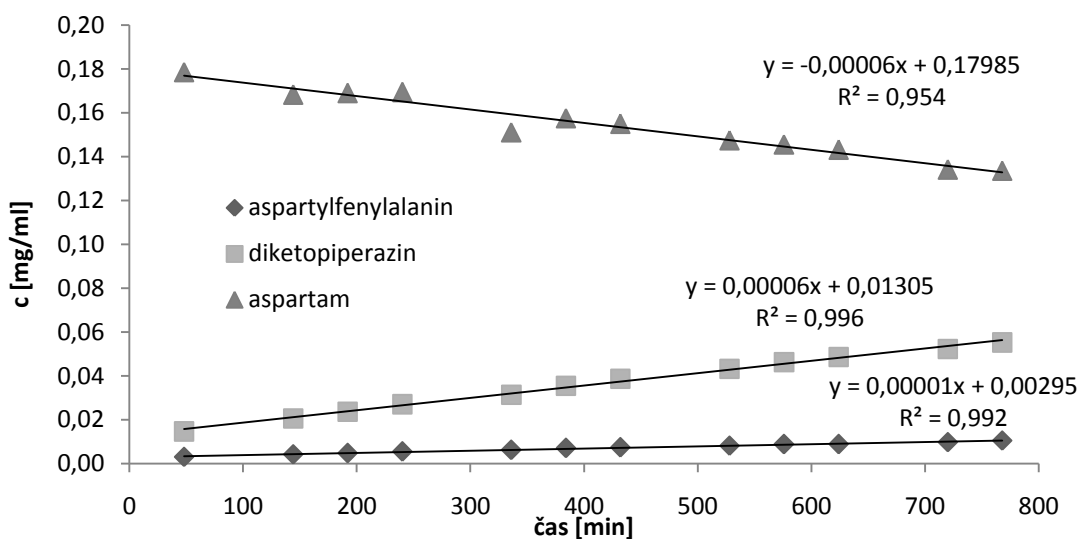
Obrázek 26 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 2



Obrázek 27 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 4



Obrázek 28 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 6



Obrázek 29 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu, diketopiperazinu a aspartamu při pH 8

Jak je zřejmé z naměřených dat, je aspartam v kapalném prostředí relativně nestabilní a dle vnějších podmínek dochází k jeho rozkladu. Pro simulaci vnějších podmínek jsme nejdříve využily změny hodnot pH a to 2, 4, 6 a 8.

Fenylalanin byl ve vzorcích obsažen ve velmi malém množství pod hranici detekce, a proto již s ním dále není počítáno, avšak je třeba na něj brát zřetel jako na jeden z degradačních produktů.

Při pH 2 nedocházelo ke znatelnému úbytku aspartamu, protože byl v takových množstvích, které nebylo ani citlivou metodou možno v dané koncentraci detekovat, ale i přesto docházelo k detekovatelnému nárůstu degradačních produktů. Při pH 2 bylo prokázáno, že kyselé pH je faktor rychlejší tvorby aspartylfenylalaninu než diketopiperazinu, který měl po celou dobu měření minimální tvorbu, čímž byly potvrzeny předešlé studie [14,19] o vlivech pH na tvorbu jednotlivých degradačních produktů aspartamu, v nichž jsou jasně popsány cesty, kterými se aspartam rozkládá.

Pro pH 4 byl dán předpoklad dobré stability a jen pomalé degradace aspartamu a tím i ztráty jeho sladivosti. Tento předpoklad se potvrdil. I po více než 12 hodinách nebyl zaznamenán detekovatelný rozklad aspartamu a jen malé nárůsty jeho degradačních produktů a díky, pro aspartam neutrální, pH 4 byly nárůsty obou produktů rozkladu velmi podobné. Dle dřívějších studií je aspartam v oblasti pH 3,5 – 4,5 za velmi stabilní a nemělo by docházet k jeho degradaci. Avšak třeba brát v potaz, že i sám výrobce deklaruje v

průvodním listu rozklad aspartamu po rozpuštění ve vodě v rozmezí cca 2,8 – 4,5%. Zároveň tak je třeba brát na zřetel, že po rozpuštění lze detekovat koncentrace cca do 1,5% u diketopiperazinu a do 0,5% u aspartylfenylalaninu (viz Příloha P1).

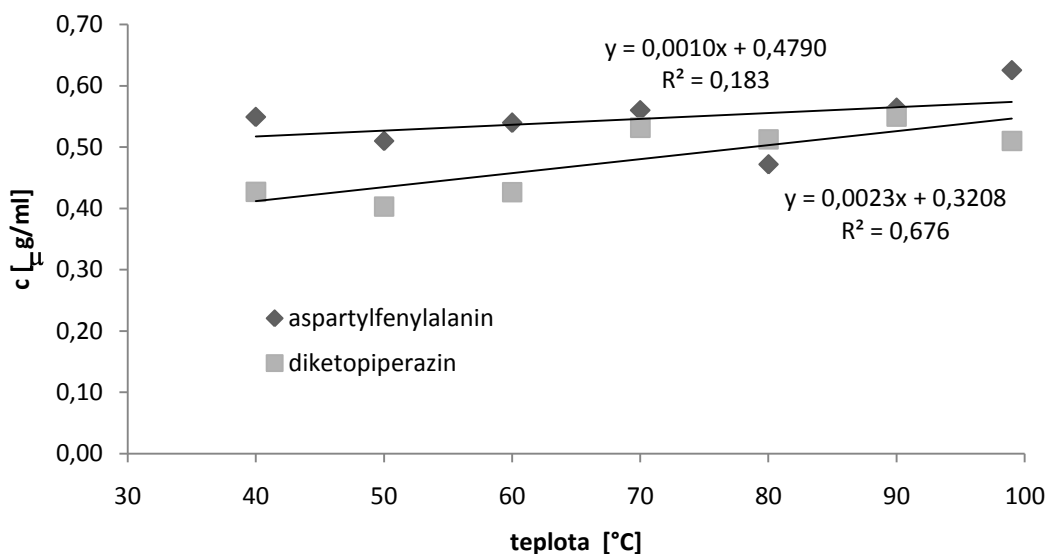
U pH 6 je již nárůst degradačních produktů diketopiperazinu a aspartylfenylalaninu snadno detekovatelný a úbytek aspartamu lze pozorovat již po prvním měření, avšak v průběhu měření už nedocházelo k detekovatelnému úbytku aspartamu, zatímco koncentrace diketopiperazinu se navýšila cca o 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ z původní koncentrace 1,79 $\mu\text{g}/\text{ml}$ až na 6,95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aspartylfenylalanin jen cca 0,90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ z 0,35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ na 1,27 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tímto byl také potvrzen druhý předpoklad možné cesty rozkladu aspartamu, kdy je v oblasti neutrálního až alkalického pH více nestabilní než v jeho kyselé oblasti a jeho degradace je směřována ke tvorbě diketopiperazinu.

Při působení pH 8 je však již rozklad aspartamu intenzivní a tomu i odpovídá tvorba degradačních produktů. Opět se potvrdil předpoklad rychlejší tvorby diketopiperazinu nežli aspartylfenylalaninu. Při tomto pH již dochází ke vzniku degradačních produktů až v řádech několika desítek, pro diketopiperazin to je cca 41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a pro aspartylfenylalanin je to 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Míra rozkladu aspartamu je téměř souběžná se vznikem diketopiperazinu a díky tomu i s odpovídajícím množstvím metanolu. Toto pH již lze považovat pro aspartam za značně alkalické a velmi nevhodné pro jeho dlouhodobější skladování.

Při testování teplotní závislosti byl aspartam vystaven působení teplot 40, 50, 60, 70, 80, 90, a varu (voda) po dobu 10 minut při pH 2, 4, 6 a 8.

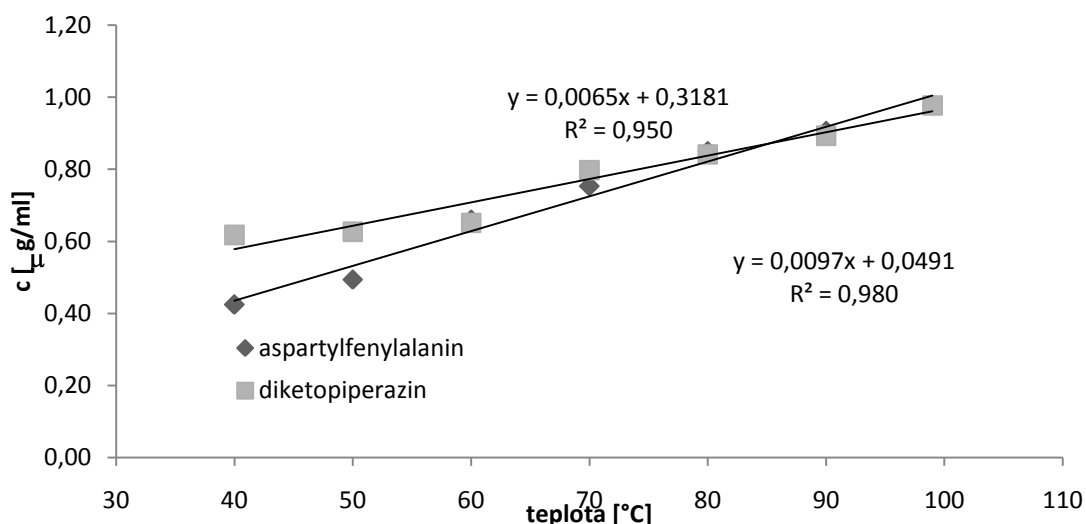
5.2.3 Teplotní závislost degradace aspartamu při různém pH

Při pH 2 byly zaznamenány koncentrace standardů aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu v řádech setin mikrogramů, což naznačuje, že v celém zkoušeném teplotním rozsahu byl aspartam při tomto pH relativně stabilní a docházelo jen k velmi malým koncentračním nárůstům, o čemž vypovídají i koncentrace aspartamu, které zůstaly téměř beze změny.



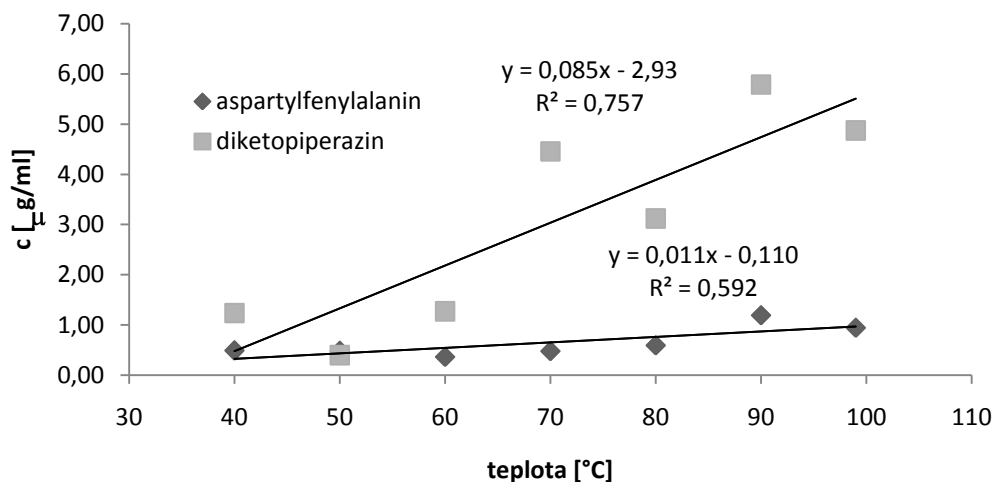
Obrázek 30 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 2 na teplotě po 10 minutách

Při působení pH 4, které se jeví jako vyhovující pro stabilitu aspartamu bylo zjištěno, že má také jisté degradační účinky, které byly potvrzeny již měřením časové závislosti na pH. Opět se potvrdily, avšak při zavedení teplotní závislosti lze pozorovat, jak aspartam snadno degraduje za zvyšující se teploty, postupně narůstaly oba degradační produkty. Při tomto pH však nemá ani jeden převahu, a tak je jejich nárůst podobný.



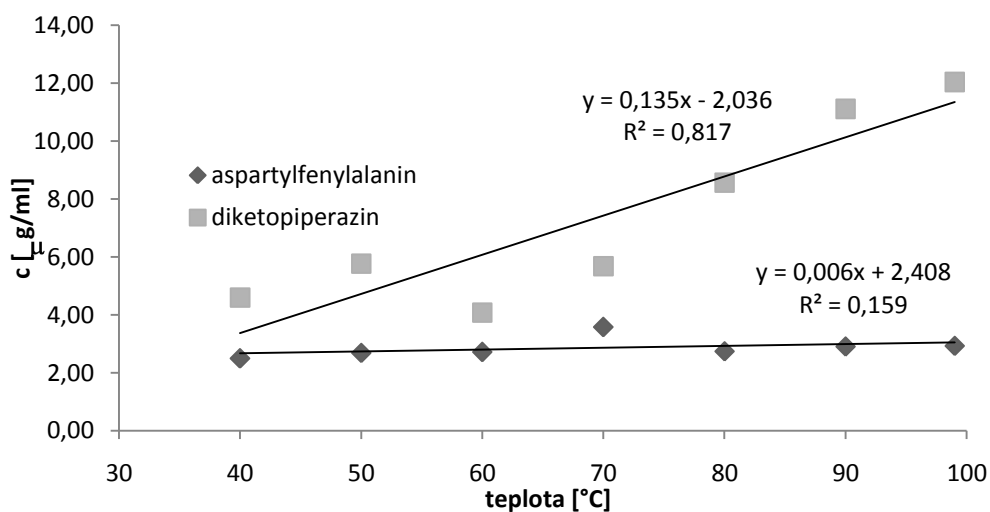
Obrázek 31 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 4 na teplotě po 10 minutách

Při působení pH 6 již byl zaznamenán jak úbytek aspartamu, tak současný nárůst diketopiperazinu a aspartylfenylalaninu. Při tomto pH již nedošlo k tak výraznému nárůstu aspartylfenylalaninu jako u diketopiperazinu. Předpokládáme, že teplotní nárůst podpořil tvorbu diketopiperazinu, která je dominantní drahou rozkladu při pH vyšším než 5.

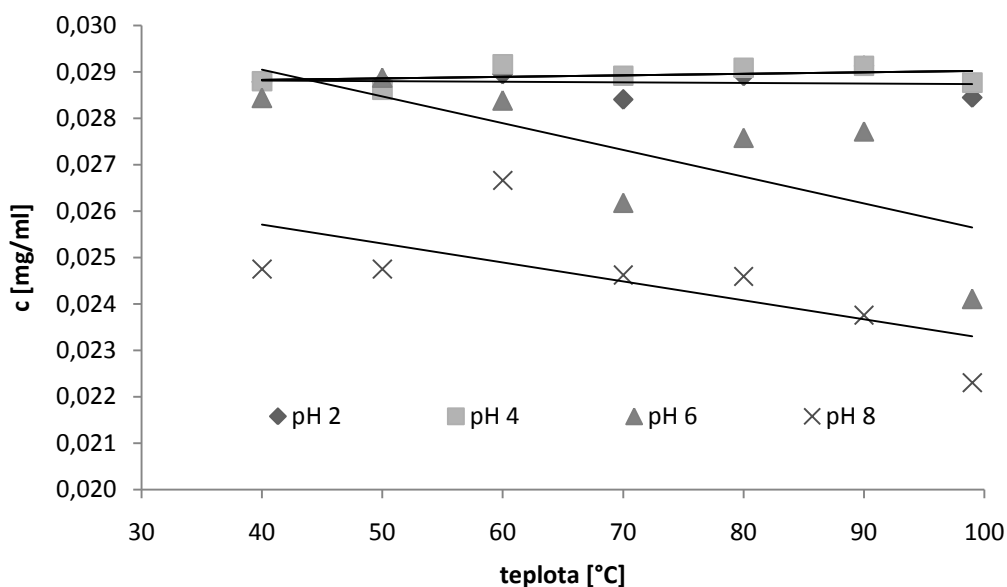


Obrázek 32 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 6 na teplotě po 10 minutách

Při pH 8 již byl zaznamenán výrazný úbytek aspartamu, který se projevil hlavně nárůstem diketopiperazinu, který je dominantním produktem pro alkalickou oblast pH. V koncentraci aspartylfenylalaninu nedocházelo k výraznějším nárůstům. Toto pH, podpořeno ještě zahříváním, prokázalo, jak snadno podléhá aspartam za těchto podmínek degradaci. Avšak tyto podmínky jsou již pro toto sladidlo brány jako extrémní.



Obrázek 33 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 8 na teplotě po 10 minutách



Obrázek 34 Závislost koncentrace aspartamu při pH 2, 4, 6 a 8 na teplotě po 10 minutách

Tabulka 4 Regresní křivky závislosti koncentrace aspartamu při pH 2, 4, 6 a 8 na teplotě po 10 minutách

pH 2	$y = -0,0000013x + 0,02887$
	$R^2 = 0,0113$
pH 4	$y = 0,0000032x + 0,02870$
	$R^2 = 0,108$
pH 6	$y = -0,0000576x + 0,03135$
	$R^2 = 0,546$
pH 8	$y = -0,0000408x + 0,02734$
	$R^2 = 0,446$

Na základě článku od autorů Pattanaargson, Chuapradit, Srisukphonraruk [19] a článku od autorů Bell a Wetzel [14] lze usuzovat, že L-aspartyl-L-fenylalanin metylester (aspartam) vykazuje určitou nestabilitu ve vodných systémech. Jeho degradace závisí na pH, koncentraci pufru a teplotě. Byly identifikovány rozkladné produkty asparagová kyselina, aspartylfenylalanin, fenylalanin metylester, fenylalanin, diketopiperazin a

izomerní produkt β -aspartam. Bylo potvrzeno, že aspartam degraduje po různých drahách v závislostech na vnějších podmínkách. V kyselém prostředí vznikají degradační produkty fenylalanin a aspartová kyselina, zatímco při pH 7 až 10 je tvořen diketopiperazin za současného uvolnění metanolu.

Aspartam byl podroben působení vybraného pH 2, 4, 6 a 8. Analýza byla provedena za $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Z analyzovaných dat je zřejmé, jak aspartam podléhá degradaci. Byly stanoveny tři produkty za sebou dle retenčních časů fenylalanin, aspartylfenylalanin a diketopiperazin. Tyto retenční časy byly při použití stejné mobilní fáze vždy stejné. Vzhledem k tomu, že fenylalanin byl jako produkt obsažen jen ve velmi malém množství a jeho detekce nebyla prokázána jako kvantitativní, ale pouze jako kvalitativní, nebylo s ním ve výsledcích počítáno. V kyselém prostředí vznikal hlavně dipeptid aspartylfenylalanin, což bylo způsobeno dle autorů Bell a Wetzel [14] pomalou tvorbou diketopiperazinu za jeho současného rozkladu a vzniku aspartylfenylalaninu a i jeho samotné tvorby z aspartamu. Tím lze vysvětlit nárůst dipeptidu aspartylfenylalaninu při pH 2 a zároveň i to, že diketopiperazin vznikal, ale jen v minimálních množstvích.

Toto tvrzení, které se podařilo v této práci také potvrdit a aplikovat, dle autorů Bell a Wetzel [14] se týká také oblasti pH 4, i když je tato oblast pH dle autorů Pattanaargson, Srisukphonraruk [19] relativně stabilní pro aspartam, dochází k úbytku aspartamu avšak tento pokles nebylo možno ani naší citlivou metodou zaznamenat. Ovšem tvorba degradačních produktů aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu, jejichž odezva je silnější nežli odezva aspartamu, byla zaznamenána a podařilo se zjistit, že tyto produkty vznikají avšak, v nerovnoměrném rozložení. Již při tomto nízkém pH začíná mít dominanci diketopiperazin nad aspartylfenylalaninem, avšak je to způsobeno pouze tím, že analýza byla měřena jen v několikahodinovém intervalu (12 hodin), kdy je tvorba diketopiperazinu nejvýraznější. Dle studií [14, 19] dochází k rozkladu diketopiperazinu v kyselém prostředí a vzniká tak aspartylfenylalanin a z něho následně fenylalanin metylester a nakonec fenylalanin a kyselina aspartová. Toto je však znatelnější až po delším časovém úseku několika dnů a více.

V oblasti pH 6 je rovnováha tvorby degradačních produktů dle autorů Bella a Wetzela [14] již posunuta ve prospěch diketopiperazinu a tvorba aspartylfenylalaninu již není tak výrazná, protože diketopiperazin nepodléhá tak snadno v této oblasti pH rozkladu jako v kyselém a středně kyselém pH, jak lze pozorovat ze získaných výsledků. Avšak ani

toto pH ještě nebylo výrazně degradační k samotnému obsahu aspartamu, v námi zkoušeném časovém úseku nebyly pozorovány výraznější měřitelné úbytky. Dle studie Bella a spol. [14] dochází k výraznému zvýšení stability DKP vůči aspartylfenylalaninu, což se také tímto měřením potvrdilo.

Pro pH 8 již však obě studie [14,19] uvádí výraznou degradaci aspartamu a vznik diketopiperazinu (s ohledem na časový průběh) jako dominantního degradačního produktu. Úbytek aspartamu a současný nárůst diketopiperazinu byly téměř shodné, jak lze pozorovat i ze získaných výsledků analýzy. Předpoklad pro další rozklad uvádí jako další dominantní produkt asparagovou kyselinu, která by měla vznikat z diketopiperazinu, ale opět v časovém posunu několika dní. Dle studie [19] došlo k rozložení aspartamu již po cca 2 dnech. Z toho lze usuzovat na nevhodnost tohoto pH pro aspartam. V potravinářství se však toto pH jako prostředí potravin nevyskytuje tak často jako pH 2, 4 a 6, a není tedy předpoklad, že by docházelo k této rychlé degradaci aspartamu.

Pro teplotní závislost byly zvoleny teploty 40, 50, 60, 70, 80, 90°C a při bodu varu vody. Pro teplotní závislost vycházíme dle studie od Bell a Wetzel [14] z předpokladu zrychlení degradačních dějů a posunutí rozkladů ještě více ve prospěch diketopiperazinu se vzrůstajícím pH. Pro pH 2 a 4 nebyl teplotní záhřev tak destruktivní, na rozdíl od pH 6 a 8, při kterých již docházelo k měřitelným úbytkům, jež byly podpořeny narůstajícím pH. To odpovídá i výsledkům studie Bella a spol. [14], kteří zjistili při kyselém pH minimální rozklad aspartamu a nárůst aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu, zatímco při pH vyšším než 6 již dochází k úbytku aspartamu a výraznému nárůstu aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu.

5.3 Souhrnná diskuze

Provedenou analýzou roztoku aspartamu podrobeného simulacím prostředí pH a teploty byla potvrzena jeho nestabilita ve vodném prostředí. Jednotlivé vlivy měly různý degradační účinek a také různé dráhy vzniků těchto produktů. Tyto výsledky jsou důležité pro případné skladování aspartamu ve výrobcích s vodným prostředím. Jeho rozpadem totiž vznikají jak toxické, tak i netoxické produkty. Jako obecně rizikové degradační produkty aspartamu lze považovat diketopiperazin a metanol.

Z výsledků této analýzy a dle prací Bella a spol. a Pattanaargsona a spol.[19] vyplývá, že se aspartam při podrobení různému pH rozkládá různými způsoby. Bylo

zjištěno, že jsou dva dominantní způsoby jeho degradace. První způsob degradace aspartamu je v kyselém prostředí zhruba do pH 5. V této oblasti aspartam, který je ve své podstatě metylovaný dipeptid, podléhá kyselé hydrolyze za vzniku degradačních produktů fenylalaninu, metylester fenylalaninu, kyseliny asparagové a aspartylfenylalaninu za současného uvolnění metanolu. Za podmínek simulovaných touto prací byl dominantním produktem této dráhy dipeptid aspartylfenylalanin. Koncentrace takto vznikajícího degradačního produktu nebyla tak výrazná a nedosahovala vysokých koncentrací. To je dáno dobrou stabilitou aspartamu v kyselém prostředí, kdy je nejvyšší stability dosaženo v rozmezí pH 3,5-4,5. Taky je třeba brát v úvahu, že po rozpuštění aspartamu ve vodě byla zaznamenána přítomnost této látky. Při simulaci podmínek různého pH se potvrdil předpoklad daný teoretickou částí této práce, že k jeho tvorbě dochází pouze v silně kyselém prostředí. Tato práce také ověřila tepelnou stabilitu aspartamu, která se v kyselé oblasti projevila jako vyšší oproti neutrálnímu a alkalickému prostředí. Zajímavým faktem bylo, že v silně kyselém prostředí se projevila větší odolnost aspartamu vůči degradaci s narůstající teplotou, ale počáteční degradace dosahovala vyšších koncentrací produktů aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu než u roztoku vzorku aspartamu, zatímco u mírně kyselého pH byla pozorována závislost degradace aspartamu s narůstající teplotou. Z toho lze vyvodit závěr, že aspartam je s narůstající teplotou víc nestabilní. V kyselé oblasti však nedocházelo k měřitelným úbytkům aspartamu, tudíž ani ke ztrátě jeho sladivosti. Koncentrace degradačních produktů již byla detekována, avšak při aplikaci na zátěž pro lidský organizmus jsou zcela zanedbatelné a došlo by k jejich odbourání dříve, než by se mohl nějaký jejich zdravotní účinek projevit. Tato oblast pH totiž není vhodná k tvorbě nebezpečného produktu diketopiperazinu. Problematický by mohl být pouze rozklad aspartylfenylalaninu na asparagovou kyselinu a fenylalanin, ale to jen u lidí trpících fenylketonurií, a i tak by musel být aspartam konzumován řádově v 1000 mg, což není díky jeho sladivosti pravděpodobné.

Druhou možnou drahou degradace aspartamu dle výsledků analýzy a dle Gainese a spol. [4] je cyklizace na diketopiperazin. Tato degradační dráha je typická pro neutrální a alkalické prostředí. Dominantním produktem této dráhy je diketopiperazin. Jeho vznik je podmíněn elektronovým párem aminoskupiny aspartamu, která je v alkalickém prostředí zodpovědná za cyklizaci, a vznikne tak diketopiperazin za současného uvolnění metanolu. U této dráhy byla sledována závislost intenzity přírůstku diketopiperazinu na vzrůstajícím pH. S posouvajícím se pH do alkalické oblasti stoupala také dominance a rychlost tvorby

diketopiperazinu. V neutrální oblasti již měl diketopiperazin převahu nad všemi degradačními produkty, ale úbytek aspartamu ještě nebyl v našem časovém úseku měřitelný. V alkalické oblasti však již aspartam snadno podlehl degradaci a došlo k jeho výrazné ztrátě, která byla téměř úměrná nárůstu diketopiperazinu. V alkalickém pH dochází dle Pattanaargsona a spol.[19] již po dvou dnech k úplné degradaci aspartamu, a to i za chladírenských teplot, a došlo by tak k úplné ztrátě sladivosti. Teplotní závislost již v oblasti neutrálního pH měla za následek výraznější tvorbu diketopiperazinu oproti vzorku bez záhřevu. V alkalické oblasti došlo již po desetiminutovém záhřevu při bodu varu k poklesu aspartamu o cca 10%. Aspartam tedy není vhodný do vodného prostředí, které podléhá vysokoteplotním úpravám, pokud je neutrální či alkalické povahy. Problematika diketopiperazinu vznikajícího z aspartamu je zanedbatelná, protože ADI diketopiperazinu je u dospělého člověka 600 mg, avšak při průměrné konzumaci aspartamu je možná produkce diketopiperazinu z aspartamu jen asi 30 mg. Pokud by mělo dojít k závažnějším zdravotním problémům, musela by být dávka diketopiperazinu cca 60000 mg [23], což není při obvyklé konzumaci aspartamu možné.

Jak bylo zmíněno, vzniká při rozkladu aspartamu oběma drahami metanol. Tato látka však nebyla stanovena, protože tato metodika neumožnila ani její kvalitativní detekci. Lze si však snadno vypočítat vzniklý obsah metanolu z úbytku aspartamu. Z toho lze také usuzovat, že v kyselé oblasti pH je vznik metanolu jen velmi omezený. Význam dostává teprve v neutrální a nejvíce v alkalické oblasti pH, kdy je předpoklad jen dvou degradačních produktů, a to právě metanolu a výše zmíněného diketopiperazinu. Avšak problematika metanolu je principiálně podobná jako u diketopiperazinu.

ZÁVĚR

Cílem teoretické části bylo zformulovat charakteristiku aspartamu a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti a charakterizovat degradační pochody s přihlédnutím na možné potravinářské faktory.

Úkolem praktické části bylo provedení experimentů, ve kterých byl sledován úbytek aspartamu v závislosti na pH, teplotě prostředí a čase, za současného vzniku degradačních produktů.

Ze získaných dat lze vyvodit, že aspartam je nestabilní ve vodných roztocích, a že se vzrůstajícím pH podléhá aspartam snáze degradaci. Narůstající teplota podporuje a urychluje degradaci aspartamu a s narůstajícím časem lze sledovat linearitu úbytku aspartamu. Relativní stabilitu má aspartam v kyselém pH. Také se podařilo identifikovat některé významné degradační produkty a podmínky jejich vzniku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [2] M. Evangelista, A.; et al. HISTORY OF ASPARTAME, **2004**. HISTORY OF ASPARTAME. http://www.wnho.net/history_of_aspartame.htm (accessed Feb 15, 2013).
- [2] Hong-shum, L.; et al. Sweeteners. *Food Additives Data Book*; Blackwell Publishing Ltd., **2011**; Chapter part 14, pp 990–999.
- [3] Piskač, P.; Chalupová, M.; Prokopcová, Š.; et al. Aspartam, **1997**. Lékopis. http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Aspartamum.htm (accessed Feb 15, 2013).
- [4] M. Gaines, S.; L. Bada, J. Aspartame Decomposition and Epimerization in the Diketopiperazine and Dipeptide Products as a Function of pH and Temperature. *J. ORG. Chem.* **1988**, (53), 2757–2764.
- [5] Acesulfame-K found in history. Sino sweeteners information. <http://www.sinosweeteners.net/archives/275> (accessed Feb 19, 2013).
- [6] Whitehouse, Ch. R.; et al. The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *Acesulfame-k* [Online] **2006**, *2008*, 255-256. <http://missclasses.com/mp3s/Prize%20CD%202010/Previous%20years/Sweeteners/review.pdf> (accessed Feb 19, 2013).
- [7] Van Horn, E. E. Artificial Sweeteners: Their origins and Mechanism.. *research, regulation and the FDA – current approved artificial Sweeteners* [Online] **2009**, LFSC 608. <http://www.clfs.umd.edu/grad/mlfsc/Artificial%20Sweeteners.pdf> (accessed Feb 19, 2013).
- [8] Remsen, I.; Fahlberg, C. Na oxidaci ortotoluenu sulfamidů. *American Chem. J.* **1880**, (1), 426–439.
- [9] Junod, S. W. Sugar: A Cautionary Tale, 2009. U. S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/History/ProductRegulation/SelectionsFromFDLIUpdateSeriesonFDAHistory/ucm091680.htm> (accessed Feb 19, 2013).
- [30] Tsang, W.; A. Clarke, M.; W. Parrish, F. Determination of Aspartame and Its Breakdown Products in Soft Drinks by Reverse-Phase Chromatography with UV Detection. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, (33), 734–738.

- [41] Berset, J.; Ochsenbein, N. Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). *Chemosphere* **2012**, (88), 563–569.
- [52] Zyglar, A.; Wasik, A.; Namieśnik, J. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends Anal. Chem.* **2009**, 9/28, 1082–1102.
- [63] Graves, D. J.; Luo, S. Decomposition of Aspartame Caused by Heat in the Acidified and Dried State. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, (35), 439–442.
- [74] Bell, L. N.; Wetzel, C. R. Aspartame Degradation in Solution As Impacted by Buffer Type and Concentration. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, (43), 2608–2612.
- [85] Soffritti, M.; Belpoggi, F.; Esposti, D. D.; Lambertini, L.; Tibaldi, E.; Rigano, A. First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administered in the Feed to Sprague – Dawley Rats. *Environ. Health Perspect.* **2005**, DOI: 10.1289/ehp.8711.
- [96] Aspartame News, 2008. Aspartame Information Service. http://www.aspartame.net/news/Aspartame_and_the_Ramazzini_Institute.asp (accessed April 13, 2).
- [107] Aspartame, 2013. European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqaspartame.htm?wtrl=01> (accessed April 13, 2).
- [118] Yakici, T.; Muhammet, A. Storage Stability of Aspartame in Orange Flavored Soft Drinks. *International J. Food Prop.* **2013**, (16:3), 698–705.
- [129] Pattanaargson, S.; Chuapradit, C.; Srisukphonraruk, S. Aspartame Degradation in Solutions at Various pH Conditions. *J. Food Sci.* **2001**, 6/66, 808–809.
- [20] Thurman, M.; Ferrer, I. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time – of – flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2010**, (1217), 4127–4134.
- [213] Wasik, A.; McCourt, J.; Buchgraber, M. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single - laboratory validation. *J. Chromatogr., A* **2007**, (1157), 187–196.

- [22] Demiralay, E. C. U.; Özkan, G.; Guzel-Seydim, Z. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia* **2006**, (63), 91–96.
- [23] Gebauer, K. Aspartam - nejčastější dotazy, 2009. Institut Galenus. <http://galenus.cz/aditiva-aspartam.php> (accessed April 26, 2013).
- [24] Tsubeli; Menexia Accelerated Kinetic Study of Aspartame Degradation in the Neutral pH Range. *Ital. J. Food Sci.* **1991**, 6/56, 1671–1675.
- [25] Bell, Leonard; Labuza, Theodore. Aspartame Degradation Kinetics as Affected by PH in Intermediate and Low Moisture Food Systems. *J. of Food Sci.* 1991, vol. 56, no. 1 s. 17-20.
- [26] Pattanaargson, S; Sanchavanakit, C. Aspartame Degradation Study Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM, 2000, Vol.14(11), Pp.987-93.* 2000, vol. 14, no. 11 s. 987-993.
- [27] Sabah, S; Scriba, G K. Determination of Aspartame and Its Degradation and Epimerization Products by Capillary Electrophoresis. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, Vol.16(6), Pp.1089-96.* 1998, vol. 16, no. 6 s. 1089-1096.
- [28] Chuy, S; Bell, L N. Kinetics of an Acid-base Catalyzed Reaction (Aspartame Degradation) as Affected by Polyol-induced Changes in Buffer PH and PK Values. *J. of Food Scie., 2009, Vol.74(1), Pp.C56-61.* 2009, vol. 74, no. 1 s. C56-C61.
- [29] Wang, R; Schroeder, S. The Effect of Caramel Coloring on the Multiple Degradation Pathways of Aspartame. *J. of Food Sci.* 2000, vol. 65, no. 7 s. 1100-1106.
- [30] Conceicao, Marta M; Fernandes, Valter J; Souza, Antonio G; Nascimento, Ticiano G; Aragao, CiCero F. S; Macedo, Rui O. Study of Thermal Degradation of Aspartame and Its Products of Conversion in Sweetener Using Isothermal Thermogravimetry and HPLC.(Report). *Thermochimica Acta, August 1, 2005, Vol.433(1-2), P.163(7).* 2005, vol. 433, no. 1 2 s. 163-2).
- [31] Moltelier, S; Wainer, I W. Direct Stereochemical Resolution of Aspartame Stereoisomers and Their Degradation Products by High-performance Liquid

- Chromatography on a Chiral Crown Ether Based Stationary Phase. *Journal of Chromatography*, 1990, Vol.516(2), Pp.365-73. 1990, vol. 516, no. 2 s. 365-373.
- [32] Fellows, J W; Chang, S W; Shazer, W H. Stability of Aspartame in Fruit Preparations Used in Yogurt. *J. of Food Sci.* 1991, vol. 56, no. 3689.
- [33] Tsubeli, Menewea; Labuza, Theodore. Influence of Dairy Proteins on Aspartame Stability in the PH 6-7 Range. *J. of Food Sci.* 1992, vol. 57, no. 2 s. 361-365.
- [34] Steigink, Lewis D; Lindgren, Scott D; Brummell, Marvin C; Stumbo, Phyllis J; Wolraich, Mark L. Erythrocyte L-aspartyl-L-phenylalanine Hydrolase Activity and Plasma Phenylalanine and Aspartate Concentrations in Children Consuming Diets High in Aspartame. *The A. J. of Clinical Nutrition*. 1995, vol. 62, no. 61206.
- [35] Kim, S. K. Photodecomposition of aspartame in aqueous solutions. *Food Chem.* **1997**, 2/59, 273–278.
- [36] Cheng, Y. D. Isothermal Fourier transform infrared microspectroscopic studies on the stability kinetics of solid-state intramolecular cyclization of aspartame sweetener.. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 3/48, 631–635.
- [37] Bell, L. N. Differentiating between the Effects of Water Activity and Glass Transition Dependent Mobility on a Solid State Chemical Reaction: Aspartame Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 11/4, 2398–2401.
- [38] Buerge, L. J.; Keller, M.; Buser, H. R.; Müller, M. D.; Poiger, T. Saccharin and other artificial sweeteners in soils: estimated inputs from agriculture and households, degradation, and leaching to groundwater.. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, (45), 615–621.
- [39] Ferrer, I.; Thurman, E. M. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry.. *J. Chromatogr., A* **2010**, (1211), 4127–4134.
- [40] George, V.; Arora, S.; Wadha, B. K.; Sing, A. K. Analysis of multiple sweeteners and their degradation products in lassi by HPLC and HPTLC plates.. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, (47), 408–413.
- [41] Furda, I.; Malizia, P. D.; Kolor, M. G.; Vernieri, P. J. Decomposition products of Laspartyl- L-phenylalanine methyl ester and their identification by gas-liquid chromatography.. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, (23), 275–182.

- [42] Homler, B. E. Properties and stability of aspartame.. *Food Sci. Technol.* **1984**, (38), 50–55.
- [43] Prodoliet, A.; Bruelhart, M. Determination of aspartame and its major decomposition products in foods.. *J. AOAC Int.* **1993**, (76), 275–282.
- [44] Sbírka zákonů č. 130 / 2010. *SBÍRKA ZÁKONŮ ČESKÁ REPUBLIKA*, 130 VYHLÁŠKA ze dne 23. dubna 2010,.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADI akceptovatelný denní příjem (mg/kg/den)

ASM aspartam

ACN acetonitril

DKP diketopiperazin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Aspartam	13
Obrázek 2 Degradace aspartamu (APM), 1 - metylester fenylalaninu, 2 – aspartylfenylalanin, 3 - diketopiperazin, 4 – fenylalanin [10]	16
Obrázek 3 Degradace aspartamu ve fosforečno-citrátovém pufru o pH 2 (a), 4 (b), 6 (c), 7 (d), 8 e), 10 (f) a 12 (g), při 4°C. APM – aspartam, Asp – Phe - aspartylfenylalanin, Asp – asparagová kyselina, PME – metylester fenylalaninu, DKP - diketopiperazin, Phe – fenylalanin [19]	17
Obrázek 4 Vznik degradačních produktů ASP v čase při 100°C v závislosti na pH. Kde $\circ\circ$ je diketopiperazin, \square je aspartylfenylalanin, Δ je fenylalanin-aspartamová kyselina a \bullet je fenylalanin. Koncentrace aspartamu nebyla měřena, ale měla by odpovídat koncentraci fenylalaninu [4, 28, 29]	18
Obrázek 5 Izokratická eluce (a) diketopiperazin (DKP) asi 2%,(b) aspartam (ASP) standard (22°C, 4 hodiny) [10].....	19
Obrázek 6 Izokratická eluce (a) standard diketopiperazinu, (b) hydrolýza ASP při pH 8 po 4 hodinách, (c) hydrolýzy ASP při pH 8 po 24 hodinách[10].....	20
Obrázek 7 Srovnání HPLC-UV chromatogramů v dietní limetko-citrónové limonádě po 6 měsících (a) a po 36 měsících (b) při 22±1°C. Píky: APM - aspartam, B - benzoan sodný, CA - kyselina citrónová (L – asparagová kyselina), 1 - fenylalanin metylester, 2=DKP, 3 - aspartylfenylalanin, 4 – fenylalanin [10]	21
Obrázek 8 Závislost náboje aspartamu na pH a jeho izoelektrický bod [11]	22
Obrázek 9 Procesy intermolekulární cyklizace v aspartamu ve vodě při pH ≥ 5. 1 – aspartam, 2 – diketopiperazin [11]	22
Obrázek 10 Vzorky vody obsahující aspartam s původní hodnotou 7,9 pH a upravenou hodnotou pH na 4,3 při teplotě místnost a při 4°C a postupný vznik diketopiperazinu. Pokojová teplota - 1, 3, 5, 7, 4°C - 2, 4, 6, 8. ASP 1-4, DKP 5-8, pH 7,9 – 1, 2, 5, 6, pH 4,3 – 3, 4, 7, 8 [11]	23
Obrázek 11 Acesulfam draselný	24
Obrázek 12 Sacharin	26
Obrázek 13 Použití analytických metod pro stanovení umělých sladidel. CE-kapilární elektroforéza, ET-elektroanalytické techniky, FIA-pomalá injekční analýza, HPLC-vysoce účinná kapalinová chromatografie, IC-iontová chromatografie,	

GC-plynová chromatografie, TLC- tenkovrstvá chromatografie, ST- spektroskopické techniky [12].....	30
Obrázek 14 Záznam rozkladu aspartamu ovlivněný pufrů dle druhu a koncentrace při pH 7 a 25°C [14]	34
Obrázek 15 Rychlostní konstanty degradace aspartamu v závislosti na koncentraci vodíkových iontů (vlevo) a hydroxylových iontů (vpravo) při 25°C [14].....	35
Obrázek 16 Aspartamu (Nutrasweet) o koncentraci 0,1 mg/ml. Kde dle retenčních časů 1,67 aspartylfenylalanin, 2,35 diketopiperazin a 3,59 aspartam (1,31 předpoklad fenylalaninu).....	46
Obrázek 17 Změna obsahu aspartamu za pH 7 při teplotě 25°C ve vodném prostředí	46
Obrázek 18 Vznik degradačních produktů při pH 7 a 25°C ve vodném prostředí	47
Obrázek 19 Změna obsahu aspartamu za pH 8 při teplotě 25°C ve vodném prostředí	47
Obrázek 20 Vznik degradačních produktů při pH 8 a 25°C ve vodném prostředí	48
Obrázek 21 Změna obsahu aspartamu za pH 9 při teplotě 25°C ve vodném prostředí a vznik jeho degradačních produktů.....	48
Obrázek 22 Kalibrační křivka standardu fenylalaninu	49
Obrázek 23 Kalibrační křivka standardu aspartylfenylalaninu.....	49
Obrázek 24 Kalibrační křivka standardu diketopiperazinu	50
Obrázek 25 Kalibrační křivka aspartamu	50
Obrázek 26 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 2.....	51
Obrázek 27 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 4.....	52
Obrázek 28 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 6.....	52
Obrázek 29 Změna koncentrace aspartylfenylalaninu, diketopiperazinu a aspartamu při pH 8.....	53
Obrázek 30 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 2 na teplotě po 10 minutách	55
Obrázek 31 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 4 na teplotě po 10 minutách	55
Obrázek 32 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 6 na teplotě po 10 minutách	56
Obrázek 33 Závislost vzniku aspartylfenylalaninu a diketopiperazinu při pH 8 na teplotě po 10 minutách	56

Obrázek 34 Závislost koncentrace aspartamu při pH 2, 4, 6 a 8 na teplotě po 10 minutách 57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Povolená sladidla a jejich E – kódy	12
Tabulka 2 Obsah aspartamu v nealko-nápojích uložených při 22±1°C [10]	20
Tabulka 3 Vliv koncentrací, typů a pH pufrů na rychlost degradace aspartamu při 25°C [14]	35
Tabulka 4 Regresní křivky závislosti koncentrace aspartamu při pH 2, 4, 6 a 8 na teplotě po 10 minutách	57

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P1: Legislativní limity náhradních sladidel.[44]

Příloha P2: Dodací list aspartamu.

PŘÍLOHA P1: LEGISLATIVNÍ LIMITY NÁHRADNÍCH SLADIDEL.

[44]

Seznam sladidel povolených při výrobě potravin a skupin potravin a podmínky jejich použití

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
E 420	Sorbitol (i) sorbitol	deserty* na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
E 421	(ii) sorbitol sirup	deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
E 953	Mannitol	deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
4 965	Isomalt	deserty na bázi vajec se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
	Maltitol (i) maltitol	deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
	(ii) maltitol sirup	deserty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
E 966	Laktitol	deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
E 967	Xylitol	deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
E 968	Erytritol	deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		obilné snídaně a podobné výrobky na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		mražené krémy a zmrzliny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		džemy, rosoly, marmelády se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a kandované ovoce	NM
		ovocné přípravky se sníženým obsahem cukru kromě těch, které jsou určeny pro výrobu nealkoholických nápojů na bázi ovocné šťávy	NM
		cukrovinky bez přidaného cukru	NM
		cukrovinky na bázi sušeného ovoce se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		cukrovinky na bázi škrobu se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		cukrovinky na bázi kakaa se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		pomazánky na bázi kakaa, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		žvýkačka bez přidaného cukru	NM
		studené omáčky	NM
		hořčice	NM
		jemné a trvanlivé pečivo, cukrářské výrobky se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	NM
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v pevné formě	NM
		stolní sladidla	NM
E 950	Acesulfam K	ochucené nealko nápoje se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	350

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		nápoje na bázi mléka a mléčných přípravků a nápoje na bázi ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	350
		nealkoholické pivo	350
		deserty na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	350
		deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	350
		deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	350
		deserty na bázi vajec se sníženým obsahem energetické hodnoty nebo bez přidaného cukru	350
		deserty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	350
		deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	350
		ochucené snacky** na bázi škrobu a ořechů	350
		mražené krémy a zmrzliny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	800
		kompoty se sníženou energetickou hodnotou, kompoty bez přidaného cukru	350
		ovocné a zeleninové přípravky se sníženou energetickou hodnotou	350
		džemy, rosoly a marmelády se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		ovoce a zelenina v sladkokyselém nálevu	200
		cukrovinky bez přidaného cukru	500
		cukrovinky na bázi kaka, nebo sušeného ovoce se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	500
		cukrovinky na bázi škrobu se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		pomazánky na bázi kaka, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		žvýkačka bez přidaného cukru	2 000
		cider a perry	350
		tmavé pivo typu „oud bruin“, pivo s obsahem alkoholu do 1,2 % (V/V), pivo s titrační kyselostí vyšší než 30 mekv. NaOH.l ⁻¹ pivo s koncentrací původní mladiny nižší než 6 % (m/m), pivo „Biere de table /Tafelbier /Table beer“ kromě piva „Obergariges Einfachbier“	350

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		studené omáčky	350
		hořčice	350
		sladkokyselé konzervy a polokonzervy a marinády z ryb, koryšů a měkkýšů	200
		obilné snídaně s obsahem vlákniny vyšším než 15 % a obsahující nejméně 20 % otrub, se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 200
		polévky se sníženou energetickou hodnotou	110
		cukrovinky pro osvěžení dechu bez přidaného cukru	2 500
		pivo se sníženou energetickou hodnotou	25
		nápoje sestávající ze směsi nealkoholického nápoje a piva, cidru, perry, lihoviny nebo vína	350
		alkoholické nápoje obsahující méně než 15 % (V/V) alkoholu	350
		kornouty a oplatky k mraženým krémům bez přidaného cukru	2 000
		cukrovinky ve formě tablet a dražé se sníženým obsahem energetické hodnoty	500
		jemné a trvanlivé pečivo, cukrářské výrobky pro speciální výživové účely	1 000
		dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	450
		potraviny pro nízk energetickou výživu určené ke snižování tělesné hmotnosti stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	450
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v tekuté formě	350
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v pevné formě	500
		doplňky stravy na bázi vitaminů nebo minerálních látek stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. ve formě sirupů nebo žvýkacích tablet	2 000
		stolní sladidla	NM
		<i>Feinkostsalat</i>	350
		<i>Essoblaten</i>	2 000
E 951	Aspartam	ochucené nealko nápoje se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	600
		nápoje na bázi mléka a mléčných přípravků a nápoje na bázi ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	600
		nealkoholické pivo	600

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		deserty na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		deserty na bázi vajec se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		deserty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		ochucené snacky na bázi škrobu a ořechů	500
		mražené krémy a zmrzliny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	800
		kompoty se sníženou energetickou hodnotou, kompoty bez přidaného cukru	1 000
		džemy, rosoly a marmelády se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		ovocné a zeleninové přípravky se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		ovoce a zelenina v sladkokyselém nálevu	300
		cukrovinky bez přidaného cukru	1 000
		cukrovinky na bázi kaka, nebo sušeného ovoce, ořechů se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	2 000
		cukrovinky na bázi škrobu se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	2 000
		pomazánky na bázi kaka, mléka, sušeného ovoce, nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		žvýkačka bez přidaného cukru	5 500
		cider a perry	600
		tmavé pivo typu „oud bruin“ pivo s obsahem alkoholu do 1,2 % (V/V), pivo s titrační kyselostí vyšší než 30 mekv. NaOH l ⁻¹ , pivo s koncentrací původní mladiny nižší než 6 % (m/m), pivo „Biere de table/Tafelbier/Table beer“ kromě „Obergariges Einfachbier“	600
		studené omáčky	350
		hořčice	350
		sladkokyselé konzervy a polokonzervy a marinády z ryb, koryšů a měkkýšů	300

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		obilné snídaně s obsahem vlákniny vyšším než 15 % a obsahující nejméně 20 % otrub se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		polévky se sníženou energetickou hodnotou	110
		cukrovinky pro osvěžení dechu bez přidaného cukru	6 000
		pastilky pro osvěžení dechu s výraznou příchutí, bez přidaného cukru	2 000
		pivo se sníženou energetickou hodnotou	25
		nápoje sestávající ze směsi nealkoholického nápoje a piva, cidru, perry, lihoviny nebo vína	600
		alkoholické nápoje obsahující méně než 15 % (V/V) alkoholu	600
		jemné a trvanlivé pečivo, cukrářské výrobky pro speciální výživové účely	1 700
		dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	1 000
		potraviny pro nízk energetickou výživu určené ke snižování tělesné hmotnosti stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	800
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v tekuté formě	600
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v pevné formě	2 000
		doplňky stravy na bázi vitaminů nebo minerálních látek stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. ve formě sirupů nebo žvýkacích tablet	5 500
		stolní sladidla	NM
		<i>Feinkostsalat</i>	350
		<i>Essoblaten</i>	1 000
E 952	Kyselina cyklamová a její sodná a vápenatá sůl, počítáno jako volná kyselina	ochucené nealko nápoje se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	250
		nápoje na bázi mléka a mléčných přípravků nebo nápoje na bázi ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	250
		deserty na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250
		deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250
		deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		deserty na bázi vajec se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250
		deserty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250
		deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	250
		pomazánky na bázi kaka, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	500
		ovocné kompoty se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	1 000
		džemy, rosoly a marmelády se sníženou energetickou hodnotou	1 000
		ovocné a zeleninové přípravky se sníženou energetickou hodnotou	250
		nápoje sestávající ze směsi nealkoholického nápoje a piva, cidru, perry, lihoviny	250
		jemné a trvanlivé pečivo a cukrářské výrobky určené pro speciální výživové účely	1 600
		dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	400
		potraviny pro nízkoenergetickou výživu určené ke snižování tělesné hmotnosti stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	400
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v tekuté formě	400
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v pevné formě	500
		doplňky stravy na bázi vitaminů nebo minerálních látek stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. ve formě sirupů nebo žvýkacích tablet	1 250
		stolní sladidla	NM
E 954	Sacharin a jeho sodná, draselná a vápenatá sůl, počítáno jako volný imid	ochucené nealko nápoje se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	80
		nápoje na bázi mléka a mléčných přípravků a nápoje na bázi ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po naředění podle návodu výrobce)	80
		nealkoholické pivo	80
		deserty na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		deserty na bázi vajec se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		deserty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		ochucené snacky na bázi škrobů a ořechů	100
		mražené krémy a zmrzliny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100
		kompoty se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	200
		džemy, rosoly a marmelády se sníženou energetickou hodnotou	200
		ovocné a zeleninové přípravky se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	200
		ovoce a zelenina v sladkokyselém nálevu	160
		cukrovinky bez přidaného cukru	500
		cukrovinky na bázi kakaa, nebo sušeného ovoce se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	500
		cukrovinky na bázi škrobu se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	300
		cukrovinky pro osvěžení dechu bez přidaného cukru	3 000
		oplatky	800
		pomazánky na bázi kakaa, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	200
		žvýkačka bez přidaného cukru	1 200
		cider a perry	80
		tmavé pivo typu „ <i>oud bruin</i> “ pivo s obsahem alkoholu do 1,2 % (V/V), pivo s titrační kyselostí vyšší než 30 mekv. NaOH l ⁻¹ , pivo s koncentrací původní mladiny nižší než 6 % (m/m), pivo „ <i>Biere de table /Tafelbier /Table beer</i> “, kromě piva „ <i>Obergariges Einfachbier</i> “	80
		studené omáčky	160
		hořčice	320
		sladkokyselé konzervy a polokonzervy a marinády z ryb, koryšů a měkkýšů	160
		obilné snídaně s obsahem vlákniny vyšším než 15 % a obsahující nejméně 20 % otrub, se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	100

Číslo E	Sladidlo	Potravina nebo skupina potravin	NPM mg.l ⁻¹ resp. mg.kg ⁻¹
		polévky se sníženou energetickou hodnotou	110
		nápoje sestávající ze směsi nealkoholického nápoje a piva, cidru, perry, lihoviny nebo vína	80
		alkoholické nápoje obsahující méně než 15 % obj. alkoholu	80
		kornouty a oplatky k mraženým krémům bez přidaného cukru	800
		jemné a trvanlivé pečivo a cukrářské výrobky pro speciální výživové účely	170
		dietní potraviny pro zvláštní lékařské účely stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	200
		potraviny pro nízkoenergetickou výživu určené ke snižování tělesné hmotnosti stanovené vyhláškou č. 54/2004 Sb.	240
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v tekuté formě	80
		doplňky stravy stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. v pevné formě	500
		doplňky stravy na bázi vitaminů nebo minerálních látek stanovené vyhláškou č. 225/2008 Sb. ve formě sirupů nebo žvýkacích tablet	1 200
		stolní sladidla	NM
		„Gaseosa“, nealkoholický nápoj na bázi vody s přidaným oxidem uhličitým, náhradními sladidly a látkami určenými k aromatizaci	100
		<i>Essoblaten</i>	800
		<i>Feinkostsalat</i>	160
E 955	Sukralosa	ochucené nealko nápoje na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	300
		nápoje na bázi mléka a mléčných přípravků a nápoje na bázi ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	300
		deserty na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru, ochucené	400
		deserty na bázi mléka a mléčných přípravků se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	400
		deserty na bázi ovoce a zeleniny se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	400
		deserty na bázi vajec se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	400
		dezerty na bázi obilovin se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	400
		deserty na bázi tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru	400

PŘÍLOHA P 2: DODACÍ LIST K ASPARTAMU.



The NutraSweet Company

1762 Lovers Lane, Augusta, GA 30901
Telephone (800) 323-5321

Manufacturing Location
Ainomoto Euro-Aspartame
F-59520 Gravelines, France

Certificate of Analysis

(ASPARTAME (NUTRASWEET) (L-ASPARTYL-L-PHENYLALANINE METHYL ESTER))

DATE OF MANUFACTURE: 19-Apr-2011

RE-EVALUATION OR EXPIRATION DATE: 20-Apr-2016

LOT NUMBER: E104190

DOCUMENT(S): ASAG1001 Version AEASA

DESCRIPTION:	ACCEPTANCE CRITERIA	RESULTS
SWEET WHITE POWDER		
DETERMINATION		
Identification (FCC & USP-NF, PhEur)	Conforms to Standard	Conforms to Standard
Odor	Odorless	Odorless
Taste	Sweet - Free of Off Taste	Sweet - Free of Off Taste
Assay (dry basis)	98.0 to 102.0 %	99.6 %
Loss on Drying	NMT 4.5 %	2.8 %
<u>Diketopiperazine (DKP)</u>	NMT 1.5 %	<u>0.01 %</u>
Residue on Ignition	NMT 0.2%	NMT 0.2%
Heavy Metals (as Pb)	NMT 10 ppm	NMT 10 ppm
Arsenic (as As)	NMT 3 ppm	NMT 3 ppm
Lead (as Pb)	NMT 1 ppm	NMT 1 ppm
Specific Rotation	14.5 to 16.5	15.50
Transmittance	NLT 95 %	100 %
pH (0.8% solution)	4.5 to 6.0	5.24
Conductivity	NMT 30 us/cm	Conforms to specification
Other Related Substances/Chromatographic Impurities (FCC, USP-NF, PhEur)	NMT 1.5%	NMT 1.5%
Appearance of solution Ph.Eur	Passes Test **	Passes Test **
<u>L-aspartyl-L-Phenylalanine</u>	NMT 0.5%	<u>NMT 0.5%</u>
<u>L-Phenylalanine</u>	NMT 0.5%	<u>NMT 0.5%</u>
Organic volatile impurities USP-NF	Pass	Pass
Residual solvents	Passes	Passes
Total Aerobic Bacteria	NMT 250 per gram	NMT 250 per gram
Yeasts and mold	NMT 100 per gram	NMT 100 per gram
Coliforms	NMT 10 ppm	NMT 10 ppm
Salmonella	Negative	Negative
E.Coli	None Detected	None Detected
Particle size (on 150 micron)	NMT 1.0 %	0.00 %
Bulk Density	0.10 to 0.30 g/ml	Conforms to specification

ANALYSIS BASED ON WEIGHT TO WEIGHT

** CERTIFIES COMPLIANCE

CONFORMS TO THE PURITY CRITERIA OF THE FCC 7th EDITION, JECFA, USP 34/NF 29, JSSFA 7TH ED., EP 5TH ED., JPE, BP, FP, AND THE COUNCIL DIRECTIVE 95/31/EEC OF JULY 1995

RELEASED BY: Sue Senn

APPROVAL DATE: 05 May, 2011

TITLE: QR SPECIALIST

THIS DOCUMENT HAS BEEN REVIEWED AND APPROVED THROUGH A SECURE PROCESS BY THE AUTHORIZED INDIVIDUAL LISTED ABOVE