

# Stanovení acesulfamu K a aspartamu metodou HPLC

Bc. Jana Ležáková

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin  
akademický rok: 2011/2012

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana LEŽÁKOVÁ**  
Osobní číslo: **T10410**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení acesulfamu K a aspartamu metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat umělá sladidla, popsat jejich použití v potravinářství.
2. Definovat sladivost, popsat ji u umělých sladidel.
3. Princip kapalinové chromatografie.

### II. Praktická část

1. Vypracovat metodiku pro stanovení acesulfamu a aspartamu.
2. Aplikovat tuto metodu na vzorcích vybraných minerálních vod.
3. Diskuze a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. FERRER, I., THURMAN, E. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217, [cit. 2012-01-10].
2. ZYGLER, A., WASIK, A. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, Vol. 28, No. 9, [cit. 2012-01-15].
3. DOSSI, N., TONIOLO, R. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. *Chromatographia* [online]. 2006, 63, No. 11/12, [cit. 2012-01-18].
4. C. UBUK DEMIRALAY, E. et al. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia* [online]. 2006, 63, No. 1/2, [cit. 2012-01-15].
5. CANTARELLI, M. A. et al. Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115, 1128-1132, [cit. 2012-01-15].

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**1. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*





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

Příjmení a jméno: LEŽÁKOVÁ JANA

Obor: THEVP

## 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 obhajoby<sup>1)</sup>;
- 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. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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 § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít 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 2.5.2012

Ležáková

<sup>1)</sup> 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 nevýdělečně 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 nahlázení 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.*

<sup>2)</sup> *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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

<sup>3)</sup> *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). Odpírá-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 výdělku 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 výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na simultánní stanovení umělých sladidel acesulfamu K a aspartamu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly nalezeny optimální chromatografické podmínky pro jejich analýzu. Dále bylo stanoveno množství obou umělých sladidel ve vybraných vzorcích minerálních a pramenitých vod.

Klíčová slova: acesulfam K, aspartam, HPLC, minerální voda, pramenitá voda

## **ABSTRACT**

This thesis was focused on the simultaneous determination of acesulfame K and aspartame using high performance liquid chromatography (HPLC). The optimal chromatographic conditions for the separation of mentioned sweeteners were investigated. In addition, the content of both sweeteners in chosen mineral and spring waters was determined.

Keywords: acesulfame K, aspartame, HPLC, mineral water, spring water

Děkuji paní Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. za pomoc, cenné rady a připomínky při vedení mé diplomové práce. Dále děkuji paní laborantce Ing. Lence Fojtíkové za její pomoc v laboratoři. Moje poděkování patří také rodině a všem, kteří mi jakýmkoliv způsobem pomáhali a podporovali mě.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 VNÍMÁNÍ SLADKÉ CHUTI</b> .....	<b>13</b>
1.1 SLADIVOST.....	13
<b>2 CHEMICKÉ LÁTKY VYKAZUJÍCÍ SLADKOU CHUŤ</b> .....	<b>15</b>
<b>3 UMĚLÁ SLADIDLA</b> .....	<b>16</b>
3.1 UMĚLÁ SLADIDLA NEJČASTĚJI POUŽÍVANÁ KE SLAZENÍ NÁPOJŮ.....	16
<b>4 VYMEZENÍ POJMŮ</b> .....	<b>18</b>
4.1 MINERÁLNÍ VODA .....	18
4.2 PRAMENITÁ VODA .....	18
<b>5 PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH UMĚLÝCH SLADIDEL V MINERÁLNÍCH A PRAMENITÝCH VODÁCH</b> .....	<b>20</b>
5.1.1 Aspartam (ASP) .....	20
5.1.2 Acesulfam draselný .....	21
5.1.3 Sacharin sodný .....	22
5.1.4 Cyklamáty .....	22
5.1.5 Sukralóza.....	23
<b>6 CHROMATOGRAFICKÉ METODY A MOŽNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ UMĚLÝCH SLADIDEL</b> .....	<b>24</b>
6.1 DĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD .....	24
6.1.1 Rozdělení chromatografických metod podle stacionární fáze .....	24
6.1.2 Rozdělení chromatografických metod podle mobilní fáze .....	24
6.2 HPLC.....	25
6.2.1 Dělení kapalinové chromatografie podle interakcí se stacionární fází .....	25
6.2.2 Obecné schéma kapalinového chromatografu .....	26
6.2.3 Základní techniky separace .....	27
6.3 VÝPOČTY CHARAKTERISTICKÝCH VELIČIN U HPLC.....	27
6.4 VYUŽITÍ HPLC V OBLASTI ANALÝZY UMĚLÝCH SLADIDEL .....	30
6.4.1 Metoda HPLC-ELSD .....	30
6.4.2 Metoda HPLC-MS .....	31
6.4.3 Metoda HPLC/TOF-MS.....	32
6.4.4 Metoda RP-HPLC .....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>7 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE A METODIKA</b> .....	<b>35</b>
7.1 CHEMIKÁLIE.....	35
7.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	35
7.3 VZORKY MINERÁLNÍCH A PRAMENITÝCH VOD.....	36
7.3.1 Charakteristika jednotlivých vzorků .....	36
1. Vzorek A1 .....	36
4. Vzorek B1 .....	37
5. Vzorek B2 .....	37
6. Vzorek B3 .....	37
8. Vzorek C2 .....	38



9.	Vzorek C3 .....	38
10.	Vzorek D1 .....	39
11.	Vzorek D2 .....	39
12.	Vzorek D3 .....	39
7.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU .....	39
7.5	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK .....	40
7.6	KONEČNÉ CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY PRO SEPARACI ASPARTAMU A ACESULFAMU K.....	41
7.7	PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ ŘADY STANDARDŮ .....	42
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
8.1	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY ASPARTAMU A ACESULFAMU K.....	43
8.1.1	Výsledky stanovení acesulfamu K a aspartamu ve vzorcích minerálních a pramenitých vod .....	47
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>79</b>

## ÚVOD

Umělá sladidla, patřící mezi širokou skupinu aditivních látek, prodělala za poslední dvě desetiletí velký rozvoj. Stala se poměrně běžnou součástí mnoha potravin a nápojů. Poskytují vjem sladké chuti, nezpůsobují zubní kaz a zároveň svým složením nedodávají téměř žádnou energii, což oceňují hlavně diabetici a další lidé, kteří dbají na vyvážený denní přísun kalorií.

Umělá sladidla jsou látky vyrobené chemickou cestou a podléhají přísným legislativním požadavkům. Všechna tato sladidla byla podrobena dlouholetým zkoumáním jejich bezpečnosti a následně pro každé z nich byla stanovena doporučená denní dávka (ADI - Acceptable Daily Intake). Pokud hodnota ADI není překročena, nemělo by pro spotřebitele hrozit žádné zdravotní riziko. Přesto se u vnímavých osob mohou, obzvláště při časté konzumaci těchto sladidel, objevit vedlejší nežádoucí účinky.

Jedním z nejpoužívanějších a nejdiskutovanějších umělých sladidel je aspartam. Sladidlo je zdrojem fenylalaninu a z tohoto důvodu jej nesmí konzumovat osoby trpící fenylketonurií. Při jeho časté konzumaci byly zaznamenány škodlivé příznaky jako otupělost, bolesti hlavy, únava, zvyšování hmotnosti, nespavost aj. Aspartam se často používá ve směsi s acesulfamem K. Příkladem jejich společné kombinace v nápojích jsou některé limonády, minerální a pramenité vody. Limonády obsahují vysoké množství sacharidů, konzervačních látek, barviv aj., a ze zdravotního hlediska se rozhodně nevyznačují příznivým účinkem na lidský organizmus. Sacharidy (tedy spíše formulujeme termín cukry) obsažené v limonádách napomáhají ke vzniku zubního kazu a jejich vysoká spotřeba, zároveň se zvýšenou konzumací tučných jídel a nedostatkem pohybu, způsobují v konečném důsledku nadváhu a obezitu. Tyto slazené nápoje nejsou svým složením vhodné pro děti a dospělí by je měli konzumovat v omezené míře. Z tohoto hlediska se doporučuje pít především neochucené minerální a pramenité vody. Dodávají lidskému organizmu mj. hořčík, sodík, vápník, draslík a stopové prvky (fluór). Mnohé z ochucených minerálních vod jsou ale přislazovány cukrem, cukernými sirupy, invertním cukrem i umělými sladidly. Z etiket těchto nápojů lze vyčíst obsah cukrů, ale obsah umělých sladidel se mnohdy neuvádí. K jejich stanovení je možné použít metodu HPLC (High Performance Liquid Chromatography – vysoko účinnou kapalinovou chromatografií). Tato práce se zabývá kvantitativním stanovením sladidel acesulfamu K a aspartamu pomocí metody HPLC s UV detekcí.

Optimalizovaná metoda pro simultánní stanovení těchto dvou sladidel byla aplikována na vzorky minerálních a pramenitých vod.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VNÍMÁNÍ SLADKÉ CHUTI

Chuť je vnímána pomocí chuťových pohárků umístěných na povrchu jazyka; u člověka se jich na jazyku nachází okolo 10 000. Chuťové pohárky přijímají chemické informace, které souvisí s příjmem potravy. Pokud dojde k jejich stimulování, nastává reflexní sekrece trávicích šťáv, např. slin a žaludeční šťávy.

Dosud jsou známy čtyři základní typy chuťových vjemů – sladké, slané, kyselé, hořké. Kyselé vjem je zprostředkován protony, slanost ionty anorganických solí, hořká chuť je kromě organických látek vyvolána solemi hořčíku a vápníku [1]. Sladkost je zprostředkována z větší části organickými látkami (z anorganických např. solemi olova). Podmínkou vnímání sladké chuti je dostatečná rozpustnost látek ve vodě [1,2].

### 1.1 Sladivost

Přírodní i umělá sladidla se navzájem liší rozdílnou sladivostí. Plnou a přijatelnou chutí i při vysoké koncentraci vyniká disacharid sacharóza. Z tohoto důvodu se používá jako standard sladké chuti při senzoričtém hodnocení sladkosti látek (10% roztok sacharózy má sladkost 1) [3]. Míra vjemu sladkých látek závisí na jejich koncentraci v roztoku, teplotě, přítomnosti jiných látek aj. Umělá sladidla, vyrobená chemickou cestou, se vyznačují významně vyšším stupněm sladivosti než glukóza, fruktóza, maltóza nebo laktóza. Sladivost dalšího přírodního sladidla steviosidu, izolovaného z listů rostliny *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl., je až 300krát vyšší než sladivost sacharózy. Vysokou sladivostí rovněž vyniká mj. i taumatín (sladce chutnající bílkoviny izolované z plodu byliny Katamfe – *Thaumatococcus danielli* Benth.) [4]. Seznam vybraných přírodních sladidel a jejich stupeň sladivosti uvádí tabulka 1, nejčastěji používaná umělá sladidla v nápojích lze vidět v tabulce 2.

Tabulka 1 Vybraná přírodní sladidla a jejich stupeň sladivosti [4]

Název přírodního sladidla	Sladivost
Sacharóza	1,0
Glukóza	0,5 – 0,7
Fruktóza	1,3 – 1,8
Maltóza	0,3 – 0,5
Laktóza	0,2 – 0,4
Steviosid	300,0
Taumatín	3 000,0

Tabulka 2 Nejčastěji používaná umělá sladidla v nápojích [4]

Název umělého sladidla	E kód sladidla	Sladivost (sacharóza = 1,0)
Acesulfam K	E 950	200
Aspartam	E 951	350
Cyklamáty	E 952	30
Sacharin sodný	E 954	300
Sukralóza	E 955	500

## 2 CHEMICKÉ LÁTKY VYKAZUJÍCÍ SLADKOU CHUŤ

Pro slazení nápojů, potravin a léků nekalorickými náhražkami sacharózy mohou být použity buď syntetické sloučeniny, anebo přírodní produkty. V USA byla schválena čtyři umělá sladidla – sacharin, aspartam, acesulfam K a sukralóza. V Japonsku a některých dalších zemích se ke slazení používají rostlinné látky, např. diterpenoidní glykosid steviosid a bílkovina taumatin [5]. V ČR je povoleno používat do nápojů a potravin jen vybraná sladidla. Druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin uvádí Vyhláška č. 4/2008 Sb. a její příloha č.5 [6]. Označováním, balením potravin a jejich uváděním do oběhu se zabývá Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích [7].

Umělá sladidla, používající se jako náhrada za sacharózu, např. při redukčních dietách, jsou připravena chemickou cestou. Na rozdíl od sacharózy nepodporují růst bakterií v dutině ústní, a tak napomáhají předcházet vzniku zubního kazu. Umělá sladidla se nejčastěji používají ke slazení nápojů (čajů, kávy, kaka, limonád apod.) i minerálních a pramenitých vod. Lze je dělit do dvou základních skupin:

1. Chemicky připravená umělá sladidla (umělá sladidla v užším slova smyslu)
2. Náhradní cukry [8].

Podle jiného zdroje [9] lze dělit sladidla na kalorická a nekalorická.

1. Kalorická sladidla: fruktóza, sorbit (obsahují téměř stejné množství energie jako sacharóza).
2. Nekalorická sladidla: aspartam, acesulfam K, sacharin, sukralóza, neohesperidin dihydrochalkon, taumatin, alitam (uplatňují se při dodržování redukční diety a nezpůsobují zubní kaz) [9].

### 3 UMĚLÁ SLADIDLA

Umělá sladidla tvoří důležitou třídu potravinářských přísad, které jsou obvykle používané v potravinách, nápojích, cukrářství a ve farmaceutickém průmyslovém odvětví. Poskytují percepci sladké chuti, ale zároveň malý či nulový přísun energie. Umělá sladidla patří mezi nejvíce kontroverzní aditiva kvůli podezření z nepříznivých zdravotních účinků [10]. Na jedné straně vynikají užitečnými vlastnostmi a jsou vhodné pro lidi trpící cukrovkou. Na straně druhé jim často bývají připisovány vedlejší účinky jako působení dermatologických potíží, bolesti hlavy, střídání nálady, změny chování, dýchací potíže, záchvaty, alergie a rakovina.

Prokázanou bezpečnost umělých sladidel uvádí doporučená denní přijatelná dávka ADI, kterou stanovila Světová zdravotnická organizace (WHO – World Health Organization) a Světová organizace pro výživu (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations) [8]. U většiny potravinářských přísad existuje tzv. maximální možná spotřeba (sladidel a nápojů), která nepovede k překročení limitu denní přijatelné dávky (ADI).

Umělá sladidla mohou být používána odděleně či ve směsi s jinými sladidly. V nynější době je v potravinářství běžný trend používat směsi sladidel, protože některé ze sladidel může mít jako vedlejší účinek různé pachutě, a to by mohlo omezit jeho aplikaci v jídlech a nápojích. Příkladem takové směsi je sacharin a cyklamát smíchaný v poměru 1:10. Hořká pachut' sacharinu je maskovaná cyklamátem a nepříjemná pachut' cyklamátu, vnímaná některými lidmi, je maskovaná sacharinem [8,11,12].

#### 3.1 Umělá sladidla nejčastěji používaná ke slazení nápojů

Z etiket nápojů běžně dostupných v obchodní síti v ČR lze většinou snadno vyčíst, jaká sladidla byla při výrobě použita. Např. u limonád se velmi často objevuje invertovaný cukr, sirup, glukózový sirup a umělá sladidla. Do ochucených minerálních vod Mattoni a Dobré vody se přidává cukr, Hanácká kyselka obsahuje cukr a sacharin, Ondrášovka a Poděbradka jsou slazeny cukrem, aspartamem a acesulfamem K (v závislosti na příchuti), Odysseus (kromě těchto dvou umělých sladidel) obsahuje i cukr. Pramenitá voda Aquila Aquabeauty je slazena fruktózou, Rajec glukózovým sirupem nebo fruktózou a v pramenité vodě Korunní (různé příchutě) je vedle invertovaného cukru obsažen i cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K a aspartam. Korunní Silueta je slazena sukralózou.



Nejvíce zastoupená kombinace umělých sladidel byla aspartam s acesulfamem K. Z tohoto důvodu byly pro analýzu vybrány vzorky minerálních a pramenitých vod, které právě tato dvě umělá sladidla obsahovala.



Obrázek 1 Pramenitá voda  
slazená fruktózou

## 4 VYMEZENÍ POJMŮ

### 4.1 Minerální voda

Přírodní minerální voda je mikrobiologicky čistá podzemní voda získaná ze zdroje přírodní minerální vody, o němž bylo vydáno osvědčení Ministerstva zdravotnictví a tento zdroj dále splnil požadavky Lázeňského zákona č.164/2001 Sb. (např. kromě stanovení pásma hygienické ochrany se musí prokázat, že podzemní voda má prospěšné fyziologické účinky na lidský organismus).

Vyhláška č. 423/2001 Sb. rozlišuje pět druhů minerálních vod podle stupně mineralizace:

1. velmi slabě mineralizované s obsahem rozpuštěných pevných látek do  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ ,
2. slabě mineralizované s obsahem rozpuštěných pevných látek 50 až  $500 \text{ mg.l}^{-1}$ ,
3. středně mineralizované s obsahem rozpuštěných pevných látek  $500 \text{ mg.l}^{-1}$  až  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$ ,
4. silně mineralizované s obsahem rozpuštěných pevných látek  $1500 \text{ mg.l}^{-1}$  až  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ,
5. velmi silně mineralizované s obsahem rozpuštěných pevných látek vyšším než  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Rozpuštěné pevné látky jsou stanoveny jako odparek při  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  [13]. Podle Lázeňského zákona č. 164/2001 Sb. [14] a Vyhlášky o zdrojích a lázních č. 423/2001 Sb. [15] se v ČR za minerální vodu považuje přirozeně se vyskytující podzemní voda původní čistoty, stálého složení a vlastností, která má (z dietetického hlediska) fyziologické účinky dané obsahem rozpuštěných látek nebo jiných součástí [16].

### 4.2 Pramenitá voda

Pramenitá voda pochází z chráněného podzemního zdroje. Do místa plnění do lahví se pramenitá voda smí přepravovat pouze potrubím. Mezi povolené úpravy patří např. odželeznění. U vod sycených oxidem uhličitým musí být uvedena informace „pramenitá voda sycená“ a uveden obsah oxidu uhličitého v  $\text{g.l}^{-1}$ . Podzemní zdroj pramenité vody je možné využívat jen na základě dlouhodobého sledování, které prokáže jeho stabilitu. Na etiketě musí být uveden název zdroje s uvedením lokality čerpání i případný způsob úpravy vody. Následně stanoví příslušný vodohospodářský orgán ochranné hygienické pásmo, které

přesně vymezuje rozsah zakázaných činností a aktivit v dosahu zdroje (např. průmyslová činnost, zemědělská činnost atd.). Díky této ochraně i skutečnosti, že hlubinné zdroje jsou obvykle od povrchu izolovány desítkami a stovkami metrů horniny, jsou průsaky či znečištění zdroje člověkem prakticky vyloučeny. Na kvalitu dohlíží Státní zemědělská a potravinářská inspekce, která provádí pravidelné kontroly kvality [13].



Obrázek 2 Minerální voda slazená cukrem

## 5 PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH UMĚLÝCH SLADIDEL V MINERÁLNÍCH A PRAMENITÝCH VODÁCH

### 5.1.1 Aspartam (ASP)

Aspartam, ve formě bílého krystalického prášku, patří ve farmacii a potravinářství mezi nejpoužívanější nekalorická syntetická sladidla. Na etiketách výrobků ho lze nalézt pod kódem E 951. Chemicky jde o dipeptid metylesteru L-aspartyl-L-fenylalaninu. Sladidlo je zdrojem fenylalaninu a z tohoto důvodu je nevhodný pro osoby trpící fenylketonurií. Fenylketonurie je dědičné metabolické onemocnění spočívající v poruše přeměny fenylalaninu na tyrozin. Způsobuje ho nefunkční jaterní enzym fenylalaninhydroxyláza, který tuto reakci u zdravých lidí katalyzuje. Potraviny obsahující aspartam musí být na obale označeny varováním „Obsahuje zdroj fenylalaninu“, příp. slovy „Nevhodné pro fenylketonuriky“ [11,17]. Z aspartamu v lidském těle částečně vzniká dioxopiperazin. Jeho karcinogenita bohužel není doposud vyloučena [18].

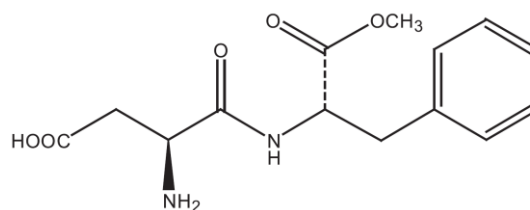
Nemá nahořklou pachut', díky tomu je jeho užívání velmi rozšířeno v potravinářském průmyslu, např. při výrobě dietních nápojů (s označením „light“). Má až 350krát větší sladivost než sacharóza. Při běžně používaných dávkách tohoto umělého sladidla žádné nebezpečí nehrozí. Aspartam není stálý při vyšších teplotách a při nižším pH [18,19]. Při pH < 3 je aspartam nestabilní a hydrolyzuje se na aspartylfenylalanin, při pH > 6 se začíná tvořit 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazinoctová kyselina.

Aspartam se po konzumaci v lidském těle rozštěpí na příslušné aminokyseliny a následně dojde k uvolnění metanolu. Metanol se v játrech oxiduje na formaldehyd, ten se dále štěpí na kyselinu mravenčí a oxid uhličitý. Fenylalanin se odbourává nebo dochází k jeho hydroxylaci na tyrozin. Sloučeniny vzniklé při metabolismu aspartamu se běžně vyskytují i v mnoha dalších potravinách, které jsou podstatně větším zdrojem těchto metabolitů než samotný aspartam [19,20,21,22,23,24,25].

Aspartamu se při vyšších koncentracích připisují nepříznivé vedlejší účinky jako křeče, vystřelující bolesti, záchvaty, bolesti hlavy, deprese, úzkosti, ztráty paměti, bolesti hlavy aj.

Jeho používání se schválene ve více než 90 zemích světa (např. v ČR, USA, Kanadě, Austrálii) [11,20,26,27,28].

Při vyšších teplotách se rozkládá na jednotlivé aminokyseliny. Hořká chuť fenylyalaninu poté převládne nad neutrální chutí kyseliny asparagové. Často se kombinuje s acesulfamem K. ADI u aspartamu je stanoveno na  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Kanadu a evropské země, v USA činí hodnota ADI  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  [19,22,30,29].

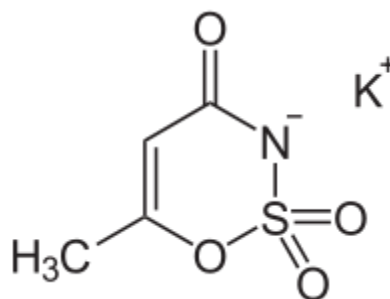


Aspartam

### 5.1.2 Acesulfam draselný

Chemicky velmi podobný sacharinu je acesulfam K (6-metyl-1,2,3-oxatiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid), označován kódem E 950. Sloučenina je kyselá, chemicky stálá a velmi dobře rozpustná ve vodě. Nejčastěji se používá jako draselná sůl. Po požití sladidla ve vyšší koncentraci zanechává v ústech mírně nahořklou pachů [11,19]. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – Sdružení odborníků pro potravinářské přídatné látky zahrnující členy jak z FAO tak WHO) došla k závěru, že je bezpečný (JECFA, 1983) [19,21,24,31]. Acesulfam draselný je schválený pro použití v potravinách a nápojích v přibližně 90 zemích [11].

Po konzumaci acesulfamu K dochází ve střevě k jeho vstřebání. Dále už nepodléhá metabolickým procesům a v nezměněné formě je vylučován močí. Pro acesulfam K byla stanovena hodnota ADI na  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Jedná se o množství látky, které lze konzumovat denně během celého života, aniž by způsobilo prokazatelné zdravotní riziko. V potravinářství se nejčastěji používá u slazených nápojů, do pečiva, cukrovinek, pastilek proti kašli, do žvýkaček, dezertů, zubních past aj. [20,21,32,33,34,35].

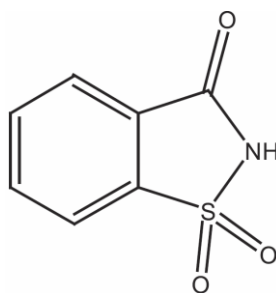


Acesulfam K

### 5.1.3 Sacharin sodný

Chemicky jde o imid 2-sulfobenzoové kyseliny. Sacharin se pod kódem E 954 dodnes používá jako nejlevnější náhrada řepného cukru. Podobně jako aspartam po požití zanechává v ústech nahořklou pachut' [19]. Jeho sladivost je 300krát vyšší než sladivost sacharózy; ve farmacii je používán k úpravě chuti tabletovaných léků. Využívá se také jako přísada do zubních past, ústních vod, žvýkaček a dietních potravin. Studie, které byly prováděné na zvířatech i lidech, nepotvrdily žádnou spojitost mezi užíváním sacharinu a nádorovým onemocněním [19].

Je velmi rozpustný a stabilní. V oblasti nízkého pH se může pomalu hydrolyzovat na 2-sulfobenzoovou kyselinu a kyselinu 2-sulfoamylobenzoovou (to způsobuje výslednou hořkou kovovou pachut'). Sacharin je považovaný za požitelný v nejméně 90 zemích světa [11,19,36].



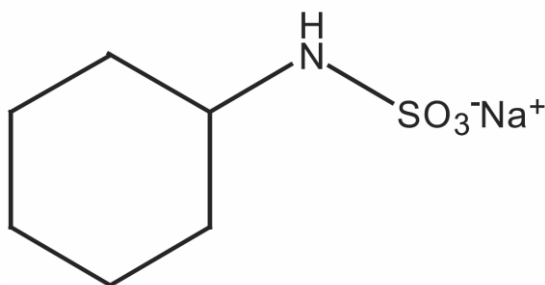
Sacharin sodný

### 5.1.4 Cyklamáty

Jsou typické svojí nahořklou chutí, ale ve spojení se sacharinem lze dosáhnout dobré sladivosti. Kyselina cyklamová je rozpustná ve vodě, její rozpustnost může být zvýšena přidávkou sodíku či soli vápníku, je stabilní v široké oblasti pH a teplot. Použití cyklamátu je dovolené v několika zemích. V USA je zakázaný kvůli podezření z toxicity účinek [11,22,37,38,24,30,29,39,21,40].

Bylo zjištěno, že různí lidé metabolizovali toto sladidlo odlišným způsobem. Evropská potravinová bezpečnostní agentura (EFSA – European Food Safety Authority) publikovala názor na bezpečnost cyklamátů tvrdící, že dostupná epidemiologická data neodhalila žádné údaje o škodlivých účincích na lidskou reprodukci. Cyklamáty nesou označení E 952.

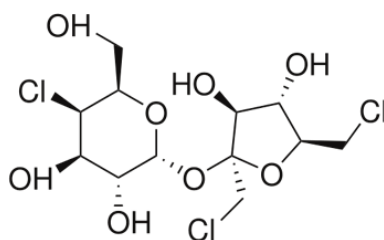
Karcinogenní není cyklamát, ale jeho metabolit cyklohexylamin. Ten vzniká ve střevě z nepatrného množství nevstřebaného cyklamátu působením bakterií (hlavně enterokoků). K této přeměně dochází u cca 10 – 30 % populace, u níž se zmetabolizuje 0,1 – 8 % cyklamátu. V případě, že je dodržen nižší příjem, než je stanovená hodnota ADI, nedojde k vytvoření dostatečného množství cyklohexylaminu, které by mělo karcinogenní účinek [11, 21,22,24,29,30,37,38,39,40].



Cyklamát sodný

### 5.1.5 Sukralóza

Sukralóza patří mezi halogenované disacharidy. Jde o trichlorovaný syntetický derivát sacharózy (chemicky: 4,1',6'-trichlorogalacto-sacharóza). Sukralóza je asi 500krát sladší než řepný cukr [19,41]. Na výrobcích je označena kódem E 955. Je nekalorická, vhodná pro diabetiky, těhotné ženy, dobře se rozpouští ve vodě, v lidském těle se nehromadí a při nízkém pH patří k tepelně nejstabilnějším umělým sladidlům. Používá se samostatně nebo v kombinaci s dalšími náhradními sladidly. ADI hodnota činí 15 mg.kg<sup>-1</sup> [42,43]. V roce 1991 byla v Kanadě potvrzena její bezpečnost a schváleno její použití v jídlech a nápojích. V roce 1998 ve Spojených státech schválil Úřad pro kontrolu potravin a léků (FDA –Food and Drug Administration) použití sukralózy v 15 potravinových a nápojových kategoriích (šlo o nejširší počáteční schválení vůbec udělené potravinářským přísadám). Později, v roce 1999, ji FDA povolil užívat jako univerzální sladidlo ve všech potravinách, nápojích a dietních doplncích. Sukralóza se smí požívat ve více než 60 zemích celého světa [44].



Sukralóza

## 6 CHROMATOGRAFICKÉ METODY A MOŽNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ UMĚLÝCH SLADIDEL

Pomocí chromatografických metod lze dělit směsi různých látek na jednotlivé složky. Dnes tyto metody patří mezi nejvýznamnější analytické i preparativní techniky. Chromatografické dělení směsi je založeno na následujícím principu: směs dělených látek se pohybuje spolu s rozpouštědlem nebo je unášena ve formě par nosným plynem a je ve styku s jinou fází, která je vůči okolí nepohyblivá a různou silou zdržuje různé složky dělené směsi. Tímto způsobem se některé složky pohybují přes nepohyblivou fázi rychleji, jiné pomaleji, někdy mohou být i zadrženy. K nestejněměrnému rozdělení mezi obě fáze dochází na základě různé afinity jednotlivých separovaných složek anebo díky jejich odlišné schopnosti difundovat do fází. Vlivem svých tepelných pohybů střídavě vnikají molekuly separovaných látek do obou fází, přičemž se liší dobou, po kterou v nich setrvávají. Tímto dynamickým procesem dochází k separaci složek. V případě, že se nachází molekuly látky více v mobilní fázi, jsou unášeny rychleji než látky, které difundují více do stacionární fáze [45,46].

### 6.1 Dělení chromatografických metod

#### 6.1.1 Rozdělení chromatografických metod podle stacionární fáze

1. Sloupcová chromatografie (kolonová chromatografie, CC – Column Chromatography) – stacionární fáze se nachází v koloně.
2. Papírová chromatografie (PP – Paper Chromatography) – stacionární fází je papír nebo upravená celulóza.
3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin Layer Chromatography) – stacionární fází je tenká vrstva suspenze.

#### 6.1.2 Rozdělení chromatografických metod podle mobilní fáze

1. Plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography) – jako mobilní fáze vystupuje plyn.
2. Fluidní chromatografie (SFC – Supercritical Fluid Chromatography) – mobilní fází je látka v nadkritickém stavu.



3. Plazmová chromatografie – mobilní fázi zde je proud iontů.
4. Kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography, UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography) – při kapalinové chromatografii vystupuje jako mobilní fáze kapalina a jako stacionární fáze pevná látka (případně kapalina zakotvená na pevné látce).

## 6.2 HPLC

HPLC patří mezi nejrozšířenější analytické fyzikálně-chemické separační metody. Termín vysoko-účinná kapalinová chromatografie se užívá v případě, je-li stacionární fázi sorbent umístěný v tenké ocelové trubici – chromatografické koloně. Tok mobilní fáze kolonou zajišťují účinná vysokotlaká pístová nebo membránová čerpadla.

Chromatografický systém je složen ze tří základních prvků – mobilní fáze, složky vzorku a stacionární fáze. Mobilní fáze unáší složky vzorku skrz stacionární fázi. Jako stacionární fáze vystupuje ta část chromatografického systému, která splňuje alespoň jednu z těchto vlastností:

1. fyzikálně-chemicky adsorbuje nebo absorbuje složky vzorku z mobilní fáze,
2. na povrchu probíhá proces iontové výměny,
3. jeho struktura je pórovitá a umožňuje separaci složek vzorku na základě efektivních rozměrů jeho molekul.

### 6.2.1 Dělení kapalinové chromatografie podle interakcí se stacionární fází

1. Sorpční chromatografie – separace se uskutečňuje specifickými interakcemi částice s povrchem adsorbentu – adsorpční chromatografie (LSC – Liquid-Solid Chromatography) nebo se stagnující kapalnou stacionární fází nanesenou na nosiči – rozdělovací (adsorpční) chromatografie (LLC – Liquid-Liquid Chromatography).
2. Gelová (permeační) chromatografie (GPC – Gel Permeation Chromatography) – separace se uskutečňuje na základě velikosti částic a velikosti pórů gelu.
3. Ionťová chromatografie (IEC – Ion-Exchange Chromatography) – k separaci iontů dochází na základě specifických interakcí s nabitým nosičem.
4. Afinitní chromatografie – stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na něž se rozdělovaná látka váže.

5. Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi.

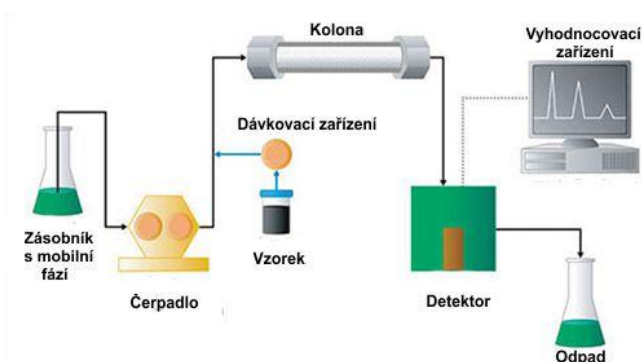
aj. [47,48].

### 6.2.2 Obecné schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf je složen z těchto částí:

1. zařízení pro uchovávání (nejčastěji skleněné lahve) a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo),
2. degasér (zařízení pro odplynění mobilních fází),
3. zařízení pro dávkování vzorku včetně autosamplerů,
4. zařízení pro separaci látek (chromatografická předkolona, kolona, termostat kolony),
5. zařízení pro detekci látek (hlavně detektory), popř. sběrač frakcí, PC [47].

Kapalinový chromatograf může mít řadu obměn. Některé součásti lze vyřadit nebo naopak přidat. Při izokratické eluci (kdy analýza probíhá za konstantních podmínek – složení mobilní fáze, průtoku mobilní fáze i teploty na koloně) je mobilní fáze ze zásobníku vedena do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci (kdy dochází k plynulé nebo skokové změně složení mobilní fáze, průtoku nebo teploty termostatu) se přiváděné proudy ze dvou nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači (je řazený před nebo za vysokotlakým čerpadlem). Odplynění mobilní fáze probíhá v odplyňovači (degaséru). Pak je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony. Ta je přímo spojena s detektorem – za něj může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Z detektoru je signál veden do datové stanice (PC) s tiskárnou [46,47,49].



Obrázek 3 Schéma kapalinového chromatografu [50]

### 6.2.3 Základní techniky separace

Lze rozlišit dvě základní techniky pro eluci a následné stanovení složek separované směsi:

1. kapalinovou chromatografii na normálních fázích (NP-HPLC) - stacionárními fázemi jsou polární oxid křemičitý (silikagel) nebo oxid hlinitý (alumina), oxidy zirkonu a další patentované organicko-anorganické materiály, mobilní fází je nepolární kapalina – nepolární organické rozpouštědlo, jako např. hexan, heptan, aceton, obvykle ve směsi s polárnějším organickým rozpouštědlem (chloroform, etanol, dichlormetan).
2. kapalinovou chromatografii na obrácených (reverzních) fázích (RP-HPLC). Separace zde probíhá na nepolární stacionární fázi, běžně na silikagelu chemicky modifikovaném nepolárními skupinami, mezi něž patří C8 (oktyl) nebo C18 (oktadecyl, nebo fenyl). Jako mobilní fáze se používají polární kapaliny metanol, acetonitril a směs vody či vodného pufru s polárním organickým rozpouštědlem. Speciálním případem jsou stacionární fáze s navázanými kyano (CN) nebo amino (NH<sub>2</sub>) skupinami, které umožňují práci jak v reverzním, tak v normálním uspořádání [46,47,49].

Tabulka 3 Dva druhy HPLC, jejich stacionární a mobilní fáze [46,47,49]

HPLC na normálních fázích		HPLC na obrácených fázích	
Stacionární fáze	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Mobilní fáze
Polární: SiO <sub>4</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Nepolární kapalina: hexan, heptan	Nepolární: silikagel (C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> )	Polární kapalina: CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> CN

### 6.3 Výpočty charakteristických veličin u HPLC

Charakteristickou veličinou pro chromatografovanou látku je eluční čas  $t_R$  nebo eluční objem  $V_R$ .

Tyto veličiny spolu souvisí vztahem:

$$V_R = t_R \cdot F_m \quad (1)$$

$F_m$  vyjadřuje objemovou rychlost toku mobilní fáze.

Eluční objem  $V_R$  je dán součtem dvou objemových veličin:

$$V_R = V'_R + V_M \quad (2)$$

kde  $V'_R$  je redukovaný eluční objem,  $V_M$  je mrtvý objem (tedy objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku, přes kolonu až po detektor).

Pro hodnocení účinnosti dané chromatografické kolony se užívá vztah pro počet teoretických pater kolony:

$$n = 16 \left( \frac{V_R}{Y_V} \right)^2 \quad (3)$$

kde  $Y_V$  je šířka píku v základně (vyjádřená v objemových jednotkách).

K popsání účinnosti dělení dvou chromatografovaných látek je zaveden pojem rozlišení:

$$R_{1,2} = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{Y_{V1} + Y_{V2}} \quad (4)$$

Účinnost dělení látek lze vyjádřit i pojmem relativní ostrost:

$$o = V_R / Y_V \quad (5)$$

Kapacitní poměr  $k$  vyjadřuje poměr celkového množství separované látky ve fázi stacionární k jejímu celkovému množství ve fázi mobilní:

$$k = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad (6)$$

kde  $K_D$  je distribuční konstanta,  $V_S$  objem stacionární fáze,  $V_M$  objem mobilní fáze v koloně, tj. mrtvý objem kolony. Mimokolonové příspěvky k mrtvému objemu se zanedbávají.

V praxi se pro výpočet používá vztah:

$$k = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (7)$$

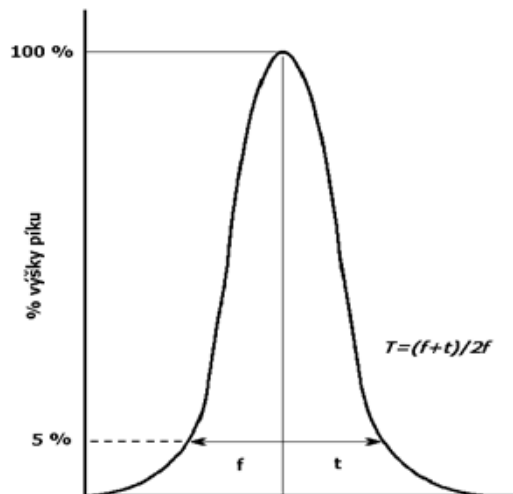
Asymetrie píku je praktická veličina kvality chromatografické kolony. Asymetrie píku je vždy nežádoucí, souvisí s účinností kolony a má negativní vliv na integraci píku, obzvlášť tehdy, pokud je nízký poměr signál-šum. Existují dvě techniky vyjádření asymetrie píku – buď jako *faktor asymetrie*  $A_S$ , který je vyjádřen jako poměr šířky píku vzestupné ( $t_P$ ) k sestupné části píku ( $f_P$ ) nejčastěji v 5 nebo 10 % výšky píku:

$$A_S = \frac{t_P}{f_P} \quad (8)$$

a nebo jako *tailing faktor*  $T$ , který je vyjádřen jako šířka píku k dvojnásobku šířky píku vzestupné části  $f_p$  v 5 % výšky píku:

$$T = \frac{f_{5\%} + t_{5\%}}{2f_{5\%}} \quad (9)$$

Pokud pík chvostuje, pak faktor asymetrie nebo tailing faktor  $>1$ , v případě, že  $<1$ , pak dochází k frontování píku [46,51,52].



Obrázek 4 Asymetrie píku a tailing faktor [53]

## 6.4 Využití HPLC v oblasti analýzy umělých sladidel

Technika HPLC umožní získat informace o identitě součástí směsi (jakostní – kvalitativní informace) a informace o jejich koncentraci (kvantitativní informace) [54]. Separaci složek v nápojích s umělými sladidly lze provádět pomocí HPLC na obrácených fázích.

Příprava vzorku ve složitých maticích pro analýzu metodou HPLC vždy zahrnuje proces čištění vzorku. Potraviny totiž obsahují konzervující látky, barviva, zahušťovadla, vitaminy, proteiny, tuky, minerální látky, všechny tyto složky mohou interferovat při stanovení sladidel. V minerálních vodách bez přídatných látek se čištění vzorku obvykle nemusí provádět. U složitějších matic se většinou pro čištění využívá extrakce tuhou fází – SPE (Solid Phase Extraction) s C18, C8 nebo polymerními sorbenty případně s náplněmi na bázi aluminy.

Pro stanovení sladidel se mohou používat metody separační, elektrochemické nebo spektrální (FTIR – Fourier Transform Infrared, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací; FT – Raman, Ramanova spektroskopie). Separací metody – plynová chromatografie (GC, GC-MS), kapalinová HPLC, IEC, TLC; ve speciálních případech CZE (Capillary Zone Electrophoresis – kapilární zónová elektroforéza). Mezi spektrální metody patří spektrofotometrie, FTIR, Ramanova spektroskopie, aj. Elektrochemické metody: potenciometrie; potenciometrická titrace HPLC se (podle způsobu detekce) dále dělí na detektory s UV, MS, ELSD (Evaporative Light Scattering Detector – detektor rozptylu světla). Jednoduché a rychlé analýzy lze provádět pomocí metody FIA se spektrofotometrickou detekcí – Flow Injection Analysis, metodou FTIR, metodou potenciometrie anebo potenciometrickou titrací [11].

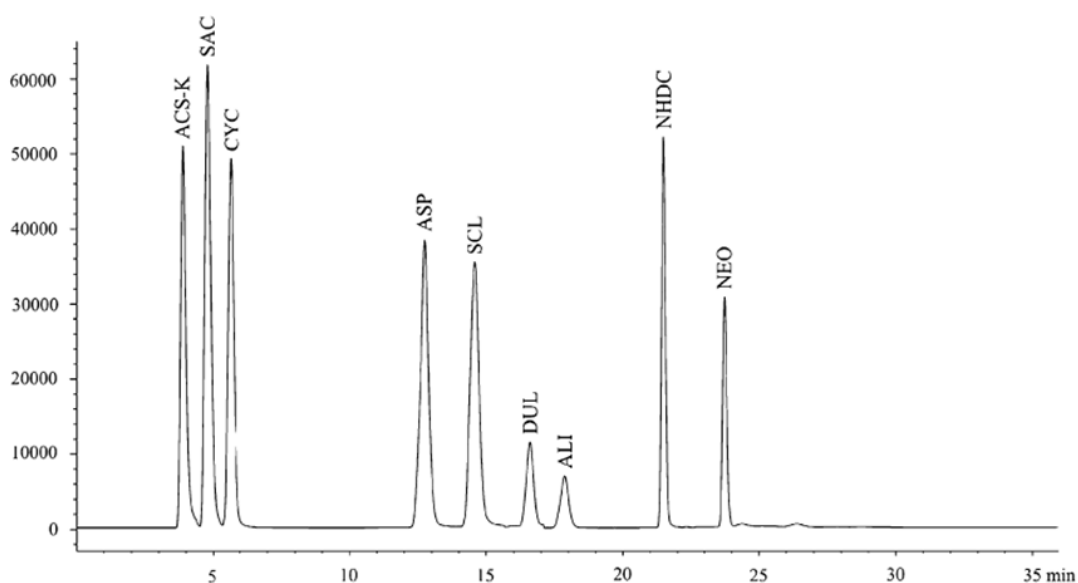
### 6.4.1 Metoda HPLC-ELSD

Andrzej Wasik a kol. [55] se zabývali simultánním stanovením devíti umělých sladidel v sycených i nesyčených nealkoholických nápojích, v jogurtu a v konzervovaném ovoci pomocí metody HPLC s ELSD detektorem. Vzorky i standardy byly rozpuštěny (extrahovány) v roztoku zředěné kyseliny mravenčí s přídavkem trimethylaminu. Pak byly vzorky čištěny pomocí SPE extrakce na kolonkách se sorbentem C18. SPE eluce byla provedena metanolem. Tím byl vzorek vyčištěn. Eluát byl odpařen dosucha a odparek rozpuštěn v roztoku pufru. Takto připravený vzorek byl podroben HPLC analýze. Byla použita RP-HPLC separace na C18 stacionární fázi, v gradientovém módu, mobilní fáze A byla složena z

metanolu, pufru a acetonu v poměru 69:24:7, mobilní fáze B z metanolu, pufru a acetonu v poměru 11:82:7. Separace proběhla za konstantního průtoku mobilní fáze  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a analyty byly detekovány pomocí ELSD detektoru. Byly testovány 4 různé kolony C18. U všech bylo zjištěno stejné pořadí eluce sladidel: ACS-K, sacharin, cyklamát, ASP, sukralóza, dulcin, alitam, NHDC, neotam [55].

#### 6.4.2 Metoda HPLC-MS

Agata Zyglar, Andrzej Wasik, Agata Kot-Wasik a Jacek Namieśnik [56] stanovovali devět hlavních umělých sladidel v různých potravinách metodou HPLC s hmotnostním detektorem. Byly použity stejné vzorky jako v minulém případě [55] – nápoje, jogurty. Vzorky i standardy byly extrahovány v roztoku pufru – mravenčí kyselina o pH 4,5 s přidavkem N,N-diizopropyletylaminu. Roztoky byly čištěny pomocí SPE extrakce na polymerním sorbentu Strata-X. Samotná HPLC separace probíhala v reverzním módu, gradientovou elucí, k detekci byl použit hmotnostní detektor, ionizace proběhla pomocí elektrospreje, detekce byla provedena v negativním módu – byly detekovány záporně nabitě ionty. Mobilní fázi A tvořila směs metanolu, pufru a acetonu. Poměr fází byl stejný jako v předešlém článku – [55]. Hmotnostnímu spektru ACS-K dominoval fragment  $m/z = 161,9$ , což odpovídá molekulovému iontu ACS-K bez draslíku  $[M - K]^-$ . U sacharinu byl dominantním záporně nabitým iontem ve spektru  $m/z = 181,9$ , tedy ion  $[M - Na]^-$ , což odpovídá ztrátě sodíku – molekulový ion bez sodíku. U cyklamátu sodného dominoval ion  $[M - Na]^-$  o  $m/z = 178,0$  – což odpovídá ztrátě sodíku z molekuly cyklamátu sodného. U ASP byl dominantní ion o  $m/z = 293,0$ , tedy deprotonizovaný molekulový ion aspartamu  $[M - H]^-$ . Na obrázku 5 je uveden chromatogram devíti analyzovaných umělých sladidel [56].



Obrázek 5 Chromatogram devíti analyzovaných umělých sladidel.

Pozn. SAC = sacharin, CYC = cyklamát, SCL = sukralóza, DUL = dulcin, ALI = alitam, NHDC = neohesperidin dihydrochalkon, NEO = neotam [56]

#### 6.4.3 Metoda HPLC/TOF-MS

Analýzou sukralózy a dalších umělých sladidel pomocí HPLC-TOF/MS (TOF – Time of Flight – průletový analyzátor) se zabývali i Imma Ferrer a E. Michael Thurman [44]. Vzorokly byly čištěny pomocí SPE extrakce. Chromatografická separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), mobilní fáze A byla acetonitril, mobilní fáze B 0,1% kyselina mravenčí. HPLC analýza byla provedena pomocí gradientové eluce s průběhem: 0 – 5 min 10 % A, 5 – 30 min 10 – 100 % A. Byla použita hmotnostní detekce s průletovým analyzátozem TOF. Byly detekovány kladně nabitě ionty – detekce v pozitivním módu. ASP: hlavní fragment  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z = 295,13$ ; Sacharin: hlavní fragment  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $m/z = 184,01$ ; Sukralóza:  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ,  $m/z = 419,00$  [44].

#### 6.4.4 Metoda RP-HPLC

Čubuk a kol. [57] analyzovali hlavní umělá sladidla a konzervanty v instantních nápojích a v Cole. Byl stanovován ASP, sacharin, ACS-K, vanilin, sorbová a benzoová kyselina. Použita byla metoda RP-LC v izokratickém módu eluce s UV detekcí, mobilní fáze A 15 % acetonitril v 0,005  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  acetátovém pufru. Mobilní fáze B byl acetonitril. Poměr A/B byl 15/85. pH mobilní fáze byl upraven na hodnotu 4,0. Byla použita kolona YMC-ODS (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Eluce proběhla v obvyklém pořadí – ACS-K, sacharin, aspartam,



vanilin, benzoová kys., sorbová kyselina. Jak autoři popisují, za určitých podmínek při analýze došlo k překrytí píku sacharinu s píkem ACS-K. Pro UV detekci byly použity vlnové délky: ACS-K 230 nm; sacharin 220 nm, ASP 203 nm, vanilin 280 nm, benzoová kyselina 225 nm, sorbová kyselina 256 nm [57].



Obrázek 6 HPLC Dionex Ultimate 3000

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 7 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE A METODIKA

Cílem práce bylo nalézt optimální chromatografické podmínky pro simultánní stanovení umělých sladidel acesulfamu K a aspartamu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vybraná metoda byla aplikována na vzorky minerálních a pramenitých vod.

### 7.1 Chemikálie

standard acesulfam K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

standard aspartam (Supelco Analytical)

dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Chrudim)

metanol pro HPLC (Lab-Scan analytical sciences)

kyselina trihydrogenfosforečná (Lab-Scan analytical sciences)

hydroxid draselný (Lab-Scan analytical sciences)

kyselina mravenčí (Penta, Chrudim)

trihydrát octanu sodného (Penta, Chrudim)

redestilovaná voda

### 7.2 Pomůcky a přístroje

předvážky (KERN, Německo)

analytické váhy (Adam, AFA - 210 - LC, Schoeller instruments, ČR)

lednice (Whirpool, Česká republika)

ultrazvuková vodní lázeň PS 04000A (Notus - Powersonic s.r.o., SR)

předkolona Ascentis Express C18 guard cartridge (2,7  $\mu\text{m}$ , 5  $\times$  4,6 mm)

kolona Ascentis Express C18 HPLC Column (2,7  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm)

HPLC přístroj Hewlett Packard 1100

kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS Column Compartment; Dionex

pH metr HI 110 Series

mikrostříkačka Hamilton

stříkačkový nylonový filtr (syringe filtr), velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$

běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 7.3 Vzorky minerálních a pramenitých vod

Pro analýzu bylo zakoupeno 12 různých druhů vzorků minerálních a pramenitých vod od 3 různých výrobců. Od každého druhu bylo zakoupeno 6 balení (6 ks). Vzorky byly zakoupeny v supermarketech v ČR, následně byly převezeny a uskladněny v laboratoři v temnu při teplotě 23 °C (klimatizovaná laboratoř). Všechny vzorky nebyly skladovány déle než 1 týden.

#### 7.3.1 Charakteristika jednotlivých vzorků

K rozboru byly použity vzorky minerálních a pramenitých vod, jemně perlivých i neperlivých. Pro kvantitativní analýzu umělých sladidel acesulfamu K a aspartamu bylo tedy vybráno 12 vzorků minerálních a pramenitých vod od tří různých výrobců, ve třech příchutích. Každá minerální nebo pramenitá voda byla v této diplomové práci záměrně označena unikátním dvoumístným kódem. Dále nebyl záměrně u vzorků uveden výrobce. Tyto údaje budou prezentovány až u obhajoby diplomové práce.

Písmeno v kódu vždy popisuje jednu sadu tří analyzovaných vod prodávaných pod stejným obchodním názvem, číslem je označena různá příchut'. Kódem A byly popsány 3 pramenité vody, pod kódy B, C a D se nachází minerální vody.

Firma, která vyrábí minerální vody zde uváděné pod kódem D (1,2,3), se vyznačuje tím, že ve svém sortimentu nabízí i minerální vody přímo vyrobené pro Kaufland. Tyto vzorky byly také podrobeny analýze. V této práci mají označení B (1,2,3).

#### 1. Vzorek A1

Ochucená pramenitá voda s cukrem a sladidly. Jemně perlivá. Sycena CO<sub>2</sub>.

Složení udané výrobcem: pramenitá voda, invertovaný cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 54 KJ (12,8 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 3 g, tuky 0 g, vláknina 0 g, sodík < 0,2 g.

## 2. Vzorek A2

Ochucená pramenitá voda s cukrem a sladidly. Jemně perlivá, sycena CO<sub>2</sub>.

Složení udané výrobcem: pramenitá voda, invertovaný cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 54 KJ (12,8 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 3 g, z toho cukry 3 g, tuky 0 g, sodík < 0,2 g.

## 3. Vzorek A3

Ochucená pramenitá voda s cukrem a sladidly. Jemně perlivá. Sycena CO<sub>2</sub>.

Složení udané výrobcem: pramenitá voda, invertovaný cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 54 KJ (12,8 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 3 g.

## 4. Vzorek B1

Ochucená minerální voda nízce mineralizovaná s cukrem a sladidly. Odželezněna. Obsah rozpuštěných látek je 107,6 mg.l<sup>-1</sup>.

Složení udané výrobcem: minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová.

Výživová hodnota ve 100 ml: energie 42 KJ (10 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 2,5 g, tuky 0 g.

## 5. Vzorek B2

Ochucená minerální voda nízce mineralizovaná, sycená, s cukrem a sladidly. Odželezněna. Obsah rozpuštěných látek je 107,6 mg.l<sup>-1</sup>.

Složení udané výrobcem: minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová.

Výživová hodnota ve 100 ml: energie 42 KJ (10 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 2,5 g, tuky 0 g.

## 6. Vzorek B3

Ochucená minerální voda nízce mineralizovaná, sycená, s cukrem a sladidly. Odželezněna. Obsah rozpuštěných látek je 107,6 mg.l<sup>-1</sup>.

Složení udané výrobcem: minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová.

Výživová hodnota ve 100 ml: energie 42 KJ (10 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 2,5 g, tuky 0 g.

### **7. Vzorek C1**

Sycená minerální voda ochucená, s cukrem a sladidly. Sycena CO<sub>2</sub> do 5 g.l<sup>-1</sup>. Pro výrobu tohoto nápoje byla použita přírodní minerální voda, středně mineralizovaná, hydrogenuhlíčitano-vápenatá, hypotonická. Obsah rozpuštěných pevných látek je 560 mg.l<sup>-1</sup>. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: přírodní minerální voda, cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 a E 211, aspartam, acesulfam K.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 42,8 KJ (10 kcal), bílkoviny < 0,05 g, sacharidy 2,5 g, cukry 2,3 g, tuky < 0,05 g, sodík 4,4 mg.

### **8. Vzorek C2**

Sycená minerální voda ochucená, s cukrem a sladidly. Sycena CO<sub>2</sub> do 5 g.l<sup>-1</sup>. Pro výrobu tohoto nápoje byla použita přírodní minerální voda, středně mineralizovaná, hydrogenuhlíčitano-vápenatá, hypotonická. Obsah rozpuštěných pevných látek je 560 mg.l<sup>-1</sup>. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: přírodní minerální voda, cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 (sorban draselný) a E 211 (benzoan sodný), aspartam, acesulfam K.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 42,8 KJ (10 kcal), bílkoviny < 0,05 g, sacharidy 2,5 g, cukry 2,3 g, tuky < 0,05 g, sodík 4,4 mg.

### **9. Vzorek C3**

Sycená minerální voda ochucená, s cukrem a sladidly. Sycena CO<sub>2</sub> do 5 g.l<sup>-1</sup>. Pro výrobu tohoto nápoje byla použita přírodní minerální voda, středně mineralizovaná, hydrogenuhlíčitano-vápenatá, hypotonická. Obsah rozpuštěných pevných látek je 560 mg.l<sup>-1</sup>. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: přírodní minerální voda, cukr, CO<sub>2</sub>, kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 a E 211, aspartam, acesulfam K.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 42,8 KJ (10 kcal), bílkoviny < 0,05 g, sacharidy 2,5 g, tuky 0,05 g, sodík < 4,4 mg.

#### 10. Vzorek D1

Sycená minerální voda ochucená, se sladidly. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: minerální voda, kyselina citronová, CO<sub>2</sub>, aroma, acesulfam K, aspartam.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 0,4 KJ (0,1 kcal), bílkoviny 0 g, sacharidy 0 g, tuky 0 g, sodík 0,05 mg.

#### 11. Vzorek D2

Nesycená minerální voda ochucená, se sladidly. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: minerální voda, kyselina citronová, aroma, konzervant benzoát sodný, acesulfam K, aspartam.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 0,4 KJ (0,1 kcal), bílkoviny < 0,1 g, sacharidy 0 g, tuky < 0,1 g, nasycené mastné kyseliny < 0,1 g, vláknina < 0,1 g, sodík 0,036 g.

#### 12. Vzorek D3

Sycená minerální voda ochucená, se sladidly, s obsahem rozpustné vlákniny a L-karnitinu. Odželezněna.

Složení udané výrobcem: minerální voda, kyselina citronová, citronan sodný, CO<sub>2</sub>, rozpustná vláknina, L-karnitin, aroma, aspartam, acesulfam K.

Výživové hodnoty ve 100 ml: energie 1,12 KJ (0,28 kcal), bílkoviny < 0,1 g, sacharidy < 0,1 g, tuky < 0,1 g, nasycené mastné kyseliny < 0,1 g, vláknina 0,1 g, sodík 0,036 g.

### 7.4 Příprava roztoků a vzorků pro HPLC analýzu

Zásobní roztoky standardů obou umělých sladidel byly připravovány o koncentraci 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Do 10 ml odměrné baňky byla kvantitativně převedena navážka 0,0010 g standardu, po rysku doplněna metanolem či redestilovanou vodou, baňka byla zabalena do alobalu a uchovávána v chladu v lednici při 8 – 9 °C.

Jako pufr byl připraven 0,1 mol.dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 4,5. Vypočítaná navážka KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> činila 6,8045 g (navážka byla kvantitativně převedena do 0,5 l odměrné baňky, po rysku dopl-

něna redestilovanou vodou). Hodnota pH byla upravena na hodnotu 4,5 pomocí KOH a  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Při hledání optimální metody bylo vyzkoušeno použití jako mobilní fáze A  $0,12 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , mobilní fází B zůstal metanol. Podle výpočtu bylo naváženo  $8,1272 \text{ g}$   $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , navážka byla kvantitativně převedena do  $0,5 \text{ l}$  odměrné baňky, řádně promíchána a doplněna po rysku. Úprava pH byla provedena pomocí HCOOH na hodnotu 4,5.

Další odzkoušenou mobilní fází A byla  $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCOOH, fází B byl opět metanol. Do  $0,5 \text{ l}$  odměrné baňky byla po rysku doplněna redestilovaná voda a následně bylo přidáno pomocí automatické pipety  $0,4 \text{ ml}$  HCOOH. Odměrná baňka byla opatřena zátkou a opatrně promíchána. Hodnota pH kyseliny mravenčí byla upravena pomocí KOH na konečnou hodnotu 4,01.

Použití  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  nebo HCOOH jako mobilní fáze A se neosvědčilo. Jak se při analýze ukázalo, tyto metody byly vhodné pouze pro stanovení samotného ACS-K.

Vzorky minerálních a pramenitých vod byly těsně před analýzou otevřeny, promíchány, bylo z nich odebráno po  $100 \text{ ml}$ , které byly přemístěny do kádinek. Poté byly vzorky v kádinkách odplyněny v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Následovala filtrace přes stříkačkový filtr nylon (velikost pórů  $0,45 \mu\text{m}$ ). Následně byly pipetovány v objemech  $1,5 \text{ ml}$  do příslušných náležitě označených tmavých vialek s teflonovým septem, které byly umístěny do autosampleru kapalinového chromatografu Dionex. Pokud byly vzorky analyzovány na přístroji HP 1100, byly vialky umístěny v temnu a vzorky byly postupně dávkovány na kolonu chromatografickou stříkačkou Hamilton.

## 7.5 Optimalizace chromatografických podmínek

Chromatografická separace a analýza standardů a vzorků minerálních a pramenitých vod byla zpočátku prováděna na přístroji Hewlett Packard 1100, v pozdější době i na novějším typu chromatografu UltiMate 3000 (Dionex). Během analýzy byla vždy udržována teplota termostatu kolony  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nejprve byl proveden výběr a optimalizace nejvhodnější metody stanovení s důrazem na kvalitní separaci sledovaných sladidel. Pro simultánní stanovení aspartamu a acesulfamu K v nápojích metodou HPLC-UV existuje několik metodik. V našem případě se vždy použila předkolona Ascentis Express C18 guard cartridge ( $2,7 \mu\text{m}$ ,  $5 \times 4,6 \text{ mm}$ ), kolona Ascentis



Express C18 HPLC Column (2,7  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm). Dávkovaný objem vzorku na kolonu činil 20  $\mu\text{l}$ .

V rámci optimalizace metody byly vyzkoušeny tyto poměry fází: 10:90, 100:0, 0:100 (metanol:octan sodný), dále 20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 90:10, 0:100 (metanol:kyselina mravenčí). Průtok se pohyboval v závislosti na tlaku v rozmezí od 0,6 – 0,9  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Jako pufr byl použit 0,1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,5. Mobilní fázi B představoval metanol. Při analýze v gradientovém módu vzrostl tlak na koloně nad tlakový limit HPLC pump (20 MPa), proto bylo od gradientové eluce ustoupeno a v dalších analýzách byla prováděna izokratická eluce. Byly testovány různé mobilní fáze A (např. 0,1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 0,4  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{HCOOH}$ ), poměry fází a rychlosti toku mobilní fáze. Mobilní fáze B byla nahrazena acetonitrilem, což přineslo jen částečný úspěch – v případě použití 0,02  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byla tato metodika stanovení vhodná pouze pro aspartam. Acesulfam K je v acetonitrilu velmi špatně rozpustný. Výsledky analýzy nebyly optimální, takže bylo přistoupeno k metodě, kdy byl při izokratické eluci použit 0,1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,5 upraveným pomocí  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a metanol. Poměr pufru a metanolu byl 7:3. Tato metoda byla aplikovaná při simultánním stanovení obou umělých sladidel ve vzorcích minerálních a pramenitých vod. Analýza byla provedena v izokratickém režimu při průtoku mobilní fáze 0,8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Doba analýzy byla nastavena na 15 min. Signál byl snímán detektorem diodového pole (DAD) při vlnových délkách 210, 220, 254 a 270 nm.

## 7.6 Konečné chromatografické podmínky pro separaci aspartamu a acesulfamu K

V našem případě byla použita technika na reverzní fázi v izokratickém módu. Jako mobilní fáze A byl použit pufr (0,1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  roztok  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 4,5; úprava pH byla provedena pomocí  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), jako fáze B bylo aplikováno polární organické rozpouštědlo metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Poměr pufru a metanolu A:B byl 7:3 po celou dobu analýzy. Jako stacionární fáze byl použit vhodný oktadecylsilikagel na koloně Ascentis Express C18 HPLC (2,7  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  4,6 mm). Jako předkolona byla použita Ascentis Express C18 guard cartridge (2,7  $\mu\text{m}$ , 5  $\times$  4,6 mm). Teplota termostatu byla udržována při 30  $^\circ\text{C}$ . Doba analýzy byla nastavena na 15 min. při průtoku mobilní fáze 0,8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Výsledné plochy píků byly odečítány při 220 nm u acesulfamu K a při vlnové délce 210 nm u aspartamu, což odpovídá vlnové délce, při které mají tyto látky nejvyšší absorpční schopnosti.

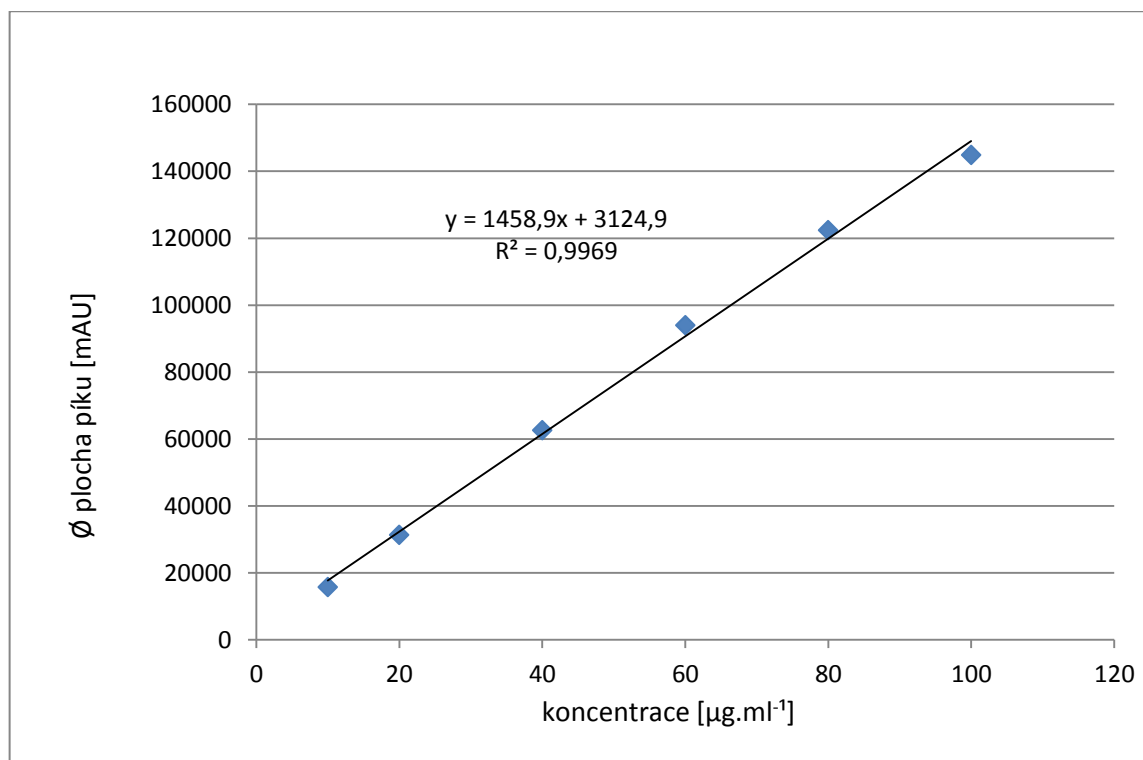
## 7.7 Příprava kalibrační řady standardů

Standardy obou umělých sladidel byly naváženy s přesností na 0,0001 g. Poté byla navážka kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a byla doplněna po rysku redestilovanou vodou. Tímto postupem byl získán zásobní roztok o koncentraci  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Následovalo důkladné protřepání a příprava kalibrační řady roztoků o koncentraci 10; 20; 40; 60 a  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (odpipetováním vypočteného objemu zásobního roztoku do odměrných baněk o objemu 10 ml a doplněním redestilovanou vodou po rysku). Z jednotlivých odměrných baněk připravené kalibrační řady bylo odpipetováno 1,5 ml do příslušných vialek. Popiskem označené vialky s těsnícím teflonovým uzávěrem byly připraveny k analýze. Chromatografická analýza probíhala za stejných chromatografických podmínek, jako je uvedeno v kapitole 7.6. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mAU) na koncentraci standardů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Po sestrojení kalibrační křivky byl z její rovnice vypočten obsah náhradního sladidla ve vzorku.

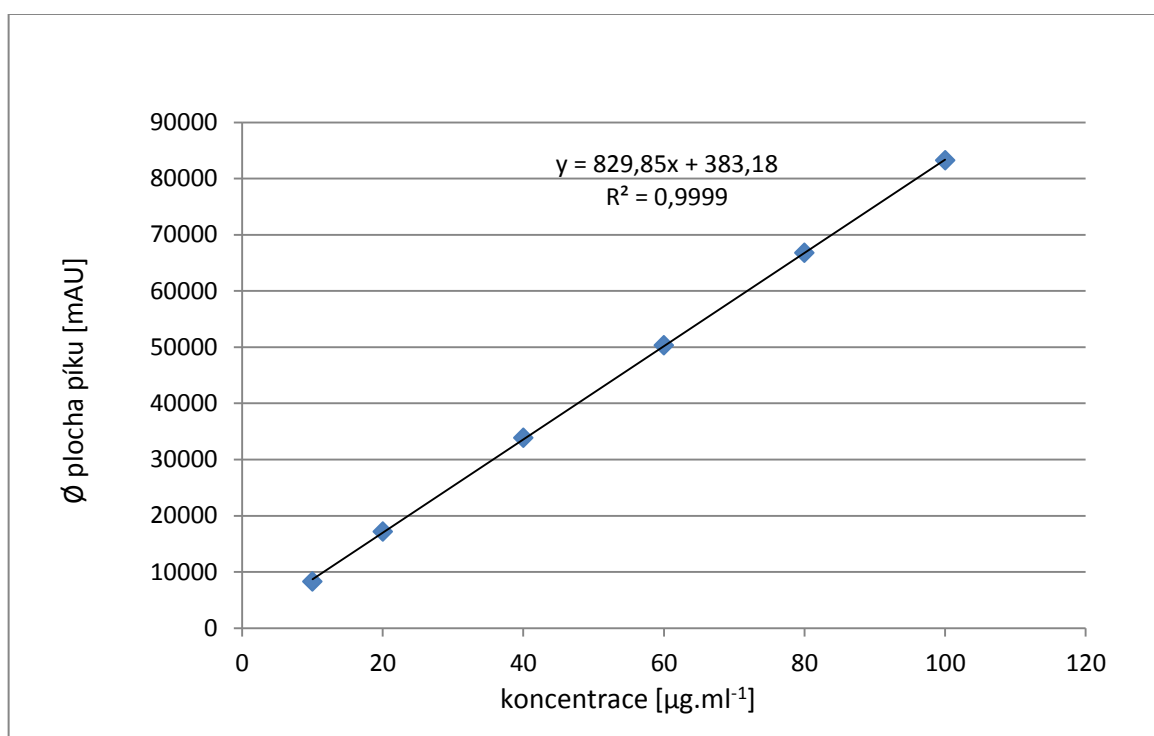
## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Výsledky měření kalibrační křivky aspartamu a acesulfamu K

Byly proměřeny velikosti plochy píků standardu aspartamu a acesulfamu K o koncentracích 10; 20; 40; 60; 80 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Každá koncentrace připravených standardů byla proměřena třikrát, detekce byla provedena při vlnové délce 210 nm pro aspartam a 220 nm pro acesulfam K. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost průměrné plochy píku A (mAU) na koncentraci umělého sladidla ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Plocha píku je přímo úměrná koncentraci vzorku. Retenční čas acesulfamu K byl 2,12 min, aspartamu 7,97 min. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4 a 5. Sestrojené kalibrační křivky lze vidět na obrázku 7 a 8. Chromatogramy standardů ACS-K a ASP jsou uvedeny v přílohách P I, II a III.



Obrázek 7 Kalibrační křivka pro stanovení acesulfamu K



Obrázek 8 Kalibrační křivka pro stanovení aspartamu

Tabulka 4 Kalibrace acesulfamu K při vlnové délce 220 nm

Koncentrace acesulfamu K [mg.ml <sup>-1</sup> ]	Plocha píku [mAU]	Průměrná plocha píku [mAU]
10	15716	15750
	15786	
	15750	
20	31399	31364
	31330	
	31364	
40	62007	62612
	62690	
	63141	
60	93902	93967
	93882	
	94119	
80	122299	122400
	122678	
	122225	
100	144894	144903
	144875	
	144941	

Tabulka 5 Kalibrace aspartamu při vlnové délce 210 nm

Koncentrace aspartamu K [mg.ml <sup>-1</sup> ]	Plocha píku [mAU]	Průměrná plocha píku [mAU]
10	8259	8293
	8299	
	8323	
20	17145	17163
	17152	
	17194	
40	33887	33839
	33605	
	34026	
60	50481	50291
	50035	
	50358	
80	66897	66762
	66666	
	66725	
100	83480	83202
	82954	
	83172	

### 8.1.1 Výsledky stanovení acesulfamu K a aspartamu ve vzorcích minerálních a pramenitých vod

Odečtená plocha píku každého vzorku byla dosazena do rovnice regrese kalibrační křivky, která má tvar  $y = 1458,9x + 3124,90$  (pro acesulfam K),  $y = 829,85x + 383,18$  (pro aspartam). Dosazením do rovnic byl vypočten obsah obou umělých sladidel ve vzorcích. Metodika stanovení obou umělých sladidel je uvedena v kapitole 7.6. Každý vzorek byl analyzován 3x. K identifikaci umělých sladidel bylo použito porovnání retenčních časů neznámých látek s retenčními časy standardů. Koncentrace těchto látek byla zjištěna odečtením velikosti ploch pod eluční křivkou. V případě významných odchylek od retenčních časů standardů byl proveden přídavek roztoku standardu ke vzorku – 750  $\mu\text{l}$  vzorku bylo smíseno se 250  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku standardu o koncentraci 100  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; roztok byl následně podroben analýze (byla použita metoda standardního přídavku). Výsledky analýzy jsou uvedeny v tabulkách 6 – 29.

Tabulka 6 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A1

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
1.	ACS-K	2,18	5312	1,50
	ASP	7,35	1672	1,55
2.	ACS-K	2,21	5297	1,49
	ASP	7,21	1678	1,56
3.	ACS-K	2,19	5283	1,48
	ASP	7,26	1782	1,69

Tabulka 7 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A1

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	S.D. [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$\mu$ [ $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
ACS-K	1,49	0,01	1,49 $\pm$ 0,01
ASP	1,60	0,06	1,60 $\pm$ 0,06

Tabulka 8 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A2

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,14	5573	1,68
	ASP	8,01	2496	2,55
2.	ACS-K	2,14	5564	1,67
	ASP	8,00	2496	2,55
3.	ACS-K	2,14	5570	1,68
	ASP	8,01	2488	2,54

Tabulka 9 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A2

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	1,68	0,01	1,68 ± 0,01
ASP	2,54	0,01	2,54 ± 0,01



Tabulka 10 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A3

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,17	5466	1,60
	ASP	8,52	2047	2,00
2.	ACS-K	2,17	5423	1,58
	ASP	8,51	2049	2,01
3.	ACS-K	2,17	5408	1,56
	ASP	8,48	2057	2,02

Tabulka 11 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A3

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	1,58	0,02	1,58 ± 0,02
ASP	2,01	0,01	2,01 ± 0,01

Tabulka 12 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B1

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	82767	54,59
	ASP	8,27	15841	18,63
2.	ACS-K	2,15	82962	54,72
	ASP	8,26	15862	18,65
3.	ACS-K	2,14	82950	54,72
	ASP	8,27	15894	18,69

Tabulka 13 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B1

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	54,68	0,06	54,68 ± 0,06
ASP	18,66	0,03	18,66 ± 0,03

Tabulka 14 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B2

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,13	87440	57,79
	ASP	8,00	18462	21,79
2.	ACS-K	2,13	87073	57,54
	ASP	8,01	18423	21,74
3.	ACS-K	2,13	87302	57,70
	ASP	8,01	18384	21,69

Tabulka 15 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B2

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	57,68	0,10	57,68 ± 0,10
ASP	21,74	0,04	21,74 ± 0,04

Tabulka 16 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B3

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	86978	57,48
	ASP	8,25	6974	7,94
2.	ACS-K	2,15	86886	57,41
	ASP	8,25	7009	7,98
3.	ACS-K	2,15	86841	57,38
	ASP	8,26	6932	7,89

Tabulka 17 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B3

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	57,42	0,04	57,42 ± 0,04
ASP	7,94	0,04	7,94 ± 0,04

Tabulka 18 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C1

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	38767	24,43
	ASP	7,89	19072	22,52
2.	ACS-K	2,15	38855	24,49
	ASP	7,89	19107	22,56
3.	ACS-K	2,15	38927	24,54
	ASP	7,93	19048	22,49

Tabulka 19 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C1

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	24,49	0,04	24,49 ± 0,04
ASP	22,53	0,03	22,53 ± 0,03

Tabulka 20 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C2

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	38533	24,27
	ASP	8,27	17782	20,97
2.	ACS-K	2,15	38582	24,30
	ASP	8,27	17761	20,94
3.	ACS-K	2,15	38530	24,27
	ASP	8,27	17798	20,99

Tabulka 21 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C2

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	24,28	0,02	24,28 ± 0,02
ASP	20,96	0,02	20,96 ± 0,02

Tabulka 22 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C3

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	70721	46,33
	ASP	8,21	18340	21,64
2.	ACS-K	2,15	70914	46,47
	ASP	8,23	18310	21,60
3.	ACS-K	2,14	70909	46,46
	ASP	8,26	18325	21,62

Tabulka 23 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C3

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	46,42	0,06	46,42 ± 0,06
ASP	21,62	0,01	21,62 ± 0,01

Tabulka 24 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D1

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	78758	51,84
	ASP	8,29	41966	50,11
2.	ACS-K	2,15	78732	51,82
	ASP	8,30	41971	50,11
3.	ACS-K	2,15	78765	51,85
	ASP	8,30	41964	50,11

Tabulka 25 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D1

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	51,84	0,01	51,84 ± 0,01
ASP	50,11	0,01	50,11 ± 0,01



Tabulka 26 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D2

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,15	85098	56,19
	ASP	8,31	41627	49,70
2.	ACS-K	2,15	84618	55,86
	ASP	8,29	41908	50,04
3.	ACS-K	2,14	85070	56,17
	ASP	8,29	41796	49,90

Tabulka 27 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D2

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	$\mu$ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	56,07	0,15	56,07 ± 0,15
ASP	49,88	0,14	49,88 ± 0,14

Tabulka 28 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D3

Měření	Druh umělého sladidla	Retenční čas [min]	Plocha píku [mAU]	Obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]
1.	ACS-K	2,13	90632	59,98
	ASP	7,97	42931	51,27
2.	ACS-K	2,13	90491	59,88
	ASP	7,99	42925	51,26
3.	ACS-K	2,13	90369	59,80
	ASP	8,00	42890	51,22

Tabulka 29 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D3

Druh umělého sladidla	Průměrný obsah sladidla [mg.l <sup>-1</sup> ]	S.D. [mg.l <sup>-1</sup> ]	μ [mg.l <sup>-1</sup> ]
ACS-K	59,89	0,07	59,89 ± 0,07
ASP	51,25	0,02	51,25 ± 0,02

Provedenou analýzou bylo u vzorků zjištěno toto průměrné množství obou umělých sladidel: pramenitá voda A1 obsahovala  $1,49 \pm 0,01$  mg.l<sup>-1</sup> acesulfamu K a  $1,60 \pm 0,06$  mg.l<sup>-1</sup> aspartamu. Ve vzorku A2 bylo naměřeno  $1,68 \pm 0,01$  mg.l<sup>-1</sup> acesulfamu K a  $2,54 \pm 0,01$  mg.l<sup>-1</sup> aspartamu. Vzorek označen kódem A3 obsahoval  $1,58 \pm 0,02$  mg.l<sup>-1</sup> ACS-K a  $2,01 \pm 0,01$  mg.l<sup>-1</sup> ASP.

Minerální voda B1 obsahovala  $54,68 \pm 0,06$  mg.l<sup>-1</sup> ACS-K a  $18,66 \pm 0,03$  mg.l<sup>-1</sup> ASP. Ve vzorku minerální vody B2 byl analýzou detekován obsah ACS-K  $57,68 \pm 0,10$  mg.l<sup>-1</sup> a  $21,74 \pm 0,04$  mg.l<sup>-1</sup> ASP. Vzorek B3 se vyznačoval obsahem  $57,42 \pm 0,04$  mg.l<sup>-1</sup> ACS-K a  $7,94 \pm 0,04$  mg.l<sup>-1</sup> ASP.

V minerální vodě C1 byl ACS-K detekován v množství  $24,49 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartam  $22,53 \pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$ . Průměrné množství acesulfamu K ve vzorku C2 bylo  $24,28 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartam byl naměřen v množství  $20,96 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ve vzorku C3 byl zjištěn obsah acesulfamu K  $46,42 \pm 0,06 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $21,62 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu.

Minerální voda D1 se vyznačovala obsahem  $51,84 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $50,11 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Acesulfam K byl u vzorku D2 zastoupen v množství  $56,07 \pm 0,15 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartamu v témže vzorku bylo  $49,88 \pm 0,14 \text{ mg.l}^{-1}$ . Vzorek D3 průměrně obsahoval  $59,89 \pm 0,07 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $51,25 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu.

Z přehledné tabulky v příloze P IV lze pro srovnání vyčíst složení deklarované výrobcem na etiketě a průměrný obsah obou sladidel ve všech analyzovaných vzorcích. Pramenitá voda označena kódem A (1,2,3) ve všech třech různých příchutích pokaždé obsahovala okolo  $1,49 - 1,58 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu a téměř srovnatelné množství aspartamu. Tento relativně nízký obsah obou umělých sladidel lze vysvětlit složením těchto pramenitých vod. Vedle ACS-K a ASP výrobce uvádí invertovaný cukr, cyklamát sodný a sacharin. Podle Zákona č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů, je povinen výrobce uvádět do složení výrobku složky, z nichž je potravina složena, sestupně podle obsahu v potravine; složky tvořící méně než 2 % množství konečného výrobku mohou být uvedeny v různém pořadí za ostatními složkami. Z takových údajů daných zákonem lze usuzovat, že v těchto analyzovaných pramenitých vodách dodával sladkou chuť ve větší míře právě invertovaný cukr.

Na základě článku *Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection*, od autorů Agata Zyglar, Andrzej Wasik, Agata Kot-Wasik a Jacek Namieśnik [56], lze usuzovat, že eluce devíti nejvýznamnějších umělých sladidel při analýze probíhá v následujícím pořadí: ACS-K, sacharin, cyklamát, ASP, sukralóza, dulcin, alitam, NHDC a neotam. Chromatogram, který ve svém článku tyto autoři uvádí, lze nalézt v příloze P V. Pro srovnání je na dalším obrázku v příloze P VI uveden chromatogram pramenité vody A3. Pro potvrzení, že pík (označen na obrázku číslem 1) patří ACS-K, byl proveden přírůstek standardu do vzorku. Na obrázku v příloze P VI je zachycen stav po přidavku ACS-K. Při chromatografické separaci na reverzní fázi je pořadí eluce jednotlivých sladidel, při použití obvyklých stacionárních a mobilních fází, vždy stejné.  $T_R \text{ ACS-K} < T_R \text{ SAC} < T_R \text{ CYC} < T_R \text{ ASP}$  ( $T_R$  = retenční čas). Vzhledem k tomu, že standardy sacharinu a cyklamátu nebyly k dispozici a rovněž nebylo možné využít hmotnostního detektoru, bylo nutné pokusit se tato sladidla

identifikovat srovnáním průběhů UV spekter. Sacharin obsahuje ve své struktuře aromatické jádro a ketoskupinu. Z toho lze usuzovat na zvýšenou absorpenci v oblasti 280 i 254 nm. Tomuto předpokladu přesně odpovídá pík č. 2. Naopak molekula cyklamátu neobsahuje ve své struktuře žádný chromofor. Toto sladidlo se pomocí UV detektoru stanovuje v oblasti 200 – 210 nm jen velmi těžko. Při vlnové délce 210 nm lze u cyklamátu očekávat jen velmi nízkou absorpenci. Proto, i v případě, že je koncentrace sacharinu ve vzorku nižší než koncentrace cyklamátu, jsou jejich hodnoty absorpance při 210 nm v opačném poměru. Samotný cyklamát lze s největší pravděpodobností přisoudit jednomu z drobných píků v oblasti  $T_R = 4$  min. Pro potvrzení či vyvrácení domněnky by stačilo provést přídavek standardů sacharinu a cyklamátu do vzorku nebo proměřit hmotnostní spektra. Pík, označen na obrázku číslem 3, patří aspartamu. Mírný posun v retenčních časech byl způsoben vzájemnou interferencí umělých sladidel a ostatních složek ve vzorku.

Autoři Agata Zyglar, Andrzej Wasik a Jacek Namieśnik ve své práci [11] uvádí, že velmi často výrobci používají kombinaci sacharinu a cyklamátu v poměru 1:10. Hořká pachův sacharinu je maskovaná cyklamátem a nepříjemná pachův cyklamátu je maskovaná sacharinem. To vysvětluje společné použití těchto dvou umělých sladidel ve vzorcích označených kódem A (1,2,3).

Zajímavé výsledky přináší analýzy minerálních vod pod kódem B (1,2,3). Výrobce těchto vod je totožný jako u vzorků D (1,2,3). Ve všech třech vzorcích B (1,2,3) byl detekován vyšší obsah acesulfamu K ( $54,68 \text{ mg.l}^{-1} - 57,68 \text{ mg.l}^{-1}$ ), kdežto aspartam byl obsažen v množství  $7,94 \text{ mg.l}^{-1}$  až  $21,74 \text{ mg.l}^{-1}$ . Takový rozdíl v přídavcích obou sladidel u žádných jiných zde analyzovaných vzorků nebyl zjištěn. Nižší obsah aspartamu byl s největší pravděpodobností způsoben jeho degradací.

Nejvyšší obsah umělých sladidel byl detekován u vzorků minerálních vod označených kódem D (1,2,3). Obsahovaly od  $51,84 \text{ mg.l}^{-1} - 59,89 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $49,88 \text{ mg.l}^{-1} - 51,25 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Vysoký podíl umělých sladidel by mohl být způsoben skutečností, že minerální vody dále ve svém složení neobsahují žádný přidaný cukr. Výrobce navíc speciálním označením doporučuje tyto minerální vody osobám, které dbají na štíhlou linii.

Minerální voda pod kódem D2 byla zajímavá svým obsahem benzoátu sodného. Byla provedena chromatografická analýza kyseliny benzoové za stejných podmínek, kterým byly podrobeny vzorky. Kyselina benzoová je bílá krystalická látka, ve vodě se špatně rozpouští, a proto se častěji do nápojů aplikuje její sodná sůl (benzoát sodný), která je ve vodě roz-

pustná velmi dobře [58]. Krystalická kyselina benzoová proto byla rozpuštěna v metanolu a podrobena analýze. Chromatogramy minerální vody D2 a kyseliny benzoové jsou uvedeny v příloze P XI. Z obou chromatogramů lze vyčíst, že ve vzorku byla s jistotou potvrzena i přítomnost benzoové kyseliny. Mírný posun v retenčních časech byl opět způsoben vzájemnou interferencí složek ve vzorku či ta skutečnost, že se jednalo o její sodnou sůl.

Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin Příl. 5, uvádí seznam sladidel povolených při výrobě potravin a skupin potravin, podmínky jejich použití a povolené množství.

Pro ochucené nealko nápoje se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů (po nařazení podle návodu výrobce) je uvedeno nejvyšší povolené množství  $350 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K. Pro aspartam je toto množství vyšší – vyhláška uvádí  $600 \text{ mg.l}^{-1}$ . Z výsledků provedené analýzy lze tedy usoudit, že žádný ze vzorků neobsahoval vyšší než povolené množství těchto dvou umělých sladidel. Nejvyšší zjištěné hodnoty ACS-K i ASP byly naměřeny u vzorku D3. Tento výsledek lze vysvětlit složením analyzovaného vzorku minerální vody D3. Vzhledem k tomu, že výrobce ve složení uvádí mj. kyselinu citronovou, citronan sodný,  $\text{CO}_2$ , rozpustnou vlákninu a L-karnitin, se lze domnívat, že sladidla aspartam i acesulfam K byly použity ve větším množství proto, aby této minerální vodě dodaly převládající sladkou chuť; v nižších koncentracích by mohl být vjem sladké chuti interferován dalšími složkami vzorku.

Zdroj [56] uvádí, že např. ve vzorku syceného nápoje (označeného číslem 1) bylo zjištěno množství  $128,5 \pm 1,2$  ACS-K a  $443,3 \pm 7,1$  ASP. Zdroj blíže neuvádí, o jaké vzorky se jednalo.

ADI u aspartamu je stanoveno na  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  pro Kanadu a evropské země, v USA činí hodnota ADI  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Pro acesulfam K byla stanovena hodnota ADI na  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Z těchto informací je zřejmé, že u vzorků nebyla překročena hodnota ADI. Lze tedy konstatovat, že všechny zde analyzované vzorky ochucených minerálních a pramenitých vod vyhovují normám a nepřekračují povolené množství ADI.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo nalézt optimální chromatografické podmínky pro simultánní stanovení umělých sladidel acesulfamu K a aspartamu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vybraná metoda byla aplikována na vzorky minerálních a pramenitých vod.

Pro stanovení umělých sladidel v nápojích existuje několik metod. Při výběru té nejvhodnější vždy záleží na složení nápoje a dostupné laboratorní technice. V našem případě byl k analýze použit přístroj typu UltiMate 3000 RS Column Compartment; Dionex, a technika separace na reverzní fázi.

Analýza vzorků byla provedena v izokratickém režimu při průtoku mobilní fáze 0,8 ml.min<sup>-1</sup>. Během analýzy, jejíž doba byla 15 min, byla udržována teplota termostatu kolony 30 °C. Signál byl snímán detektorem diodového pole (DAD) při vlnových délkách 210, 220, 254 a 270 nm.

Mobilní fáze A byl pufr (0,1 mol.dm<sup>-3</sup> roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 4,5; úprava pH byla provedena pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), fáze B metanol (CH<sub>3</sub>OH). Poměr pufru a metanolu A:B byl 7:3. Jako stacionární fáze byl použit vhodný oktadecylsilikagel, kolona Ascentis Express C18 (velikost částic 2,7 µm, rozměr kolony 150 × 4,6 mm). Jako předkolona byla použita Ascentis Express C18 guard cartridge (2,7 µm, 5 × 4,6 mm). Vzhledem k tomu, že vzorky neobsahovaly barviva a ve větším množství bílkoviny ani tuky, byla vynechána SPE extrakce. Následovalo odplynění a filtrace přes 0,45 µm, 13 mm nylonový stříkačkový filtr, a poté bylo přistoupeno k analýze.

K sestrojení kalibračních křivek byly použity standardy acesulfamu K a aspartamu. Chromatografické podmínky pro měření byly shodné jako u stanovení obou těchto sladidel ve vzorcích.

Pro kvantitativní analýzu umělých sladidel acesulfamu K a aspartamu bylo vybráno 12 vzorků minerálních a pramenitých vod od tří různých výrobců, ve třech příchutích. Každá minerální nebo pramenitá voda byla v této práci označena unikátním dvoumístným kódem. Písmeno v kódu vždy popisuje jednu sadu tří analyzovaných vod prodávaných pod stejným obchodním názvem, číslem je označena různá příchut'. Kódem A byly popsány 3 pramenité vody, pod kódy B, C a D se nachází minerální vody.

Firma, která vyrábí minerální vody zde uváděné pod kódem D (1,2,3), se vyznačuje tím, že ve svém sortimentu nabízí i minerální vody přímo vyrobené pro Kaufland. Tyto vzorky byly také podrobeny analýze. V této práci mají označení B (1,2,3).

Provedenou analýzou bylo u vzorků zjištěno toto průměrné množství obou umělých sladidel: pramenitá voda A1 obsahovala  $1,49 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $1,60 \pm 0,06 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Ve vzorku A2 bylo naměřeno  $1,68 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $2,54 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Vzorek označen kódem A3 obsahoval  $1,58 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$  ACS-K a  $2,01 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  ASP.

Minerální voda B1 obsahovala  $54,68 \pm 0,06 \text{ mg.l}^{-1}$  ACS-K a  $18,66 \pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$  ASP. Ve vzorku minerální vody B2 byl analýzou detekován obsah ACS-K  $57,68 \pm 0,10 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $21,74 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  ASP. Vzorek B3 se vyznačoval obsahem  $57,42 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  ACS-K a  $7,94 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$  ASP. V minerální vodě C1 byl ACS-K detekován v množství  $24,49 \pm 0,04 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartam  $22,53 \pm 0,03 \text{ mg.l}^{-1}$ . Průměrné množství acesulfamu K ve vzorku C2 bylo  $24,28 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartam byl naměřen v množství  $20,96 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ . Ve vzorku C3 byl zjištěn obsah acesulfamu K  $46,42 \pm 0,06 \text{ mg.l}^{-1}$  a  $21,62 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Minerální voda D1 se vyznačovala obsahem  $51,84 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $50,11 \pm 0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu. Acesulfam K byl u vzorku D2 zastoupen v množství  $56,07 \pm 0,15 \text{ mg.l}^{-1}$ , aspartamu v témže vzorku bylo  $49,88 \pm 0,14 \text{ mg.l}^{-1}$ . Vzorek D3 průměrně obsahoval  $59,89 \pm 0,07 \text{ mg.l}^{-1}$  acesulfamu K a  $51,25 \pm 0,02 \text{ mg.l}^{-1}$  aspartamu.

Zajímavé výsledky přinesly analýzy minerálních vod pod kódem B (1,2,3). Výrobce těchto vod je totožný jako u vzorků D (1,2,3). Ve všech třech vzorcích B (1,2,3) byl detekován vyšší obsah acesulfamu K ( $54,68 \text{ mg.l}^{-1} - 57,68 \text{ mg.l}^{-1}$ ), kdežto aspartam byl obsažen v množství  $7,94 \text{ mg.l}^{-1}$  až  $21,74 \text{ mg.l}^{-1}$ . Takový rozdíl v přídavcích obou sladidel u žádných jiných zde analyzovaných vzorků nebyl zjištěn. Nižší obsah aspartamu byl s největší pravděpodobností způsoben jeho degradací.

U minerálních vod C (1,2,3) – ve všech třech příchutích – byla navíc potvrzena přítomnost benzoanu sodného a kyseliny sorbové. U vody D2 byla analýzou potvrzena přítomnost konzervantu benzoanu sodného.

Chromatogramy vybraných analyzovaných vzorků a přehledná tabulka obsahující kódování vzorků, jejich složení a detekovaný obsah umělých sladidel ACS-K a ASP, se nachází v přílohách P I – XI.

Na základě zjištěného množství sladidel a jejich porovnáním s normou lze konstatovat, že všechny zde analyzované vzorky ochucených minerálních a pramenitých vod vyhovují normám a nepřekračují povolené množství ADI.

Přiřazení obchodních názvů vzorků k jejich kódům bude provedeno při obhajobě této diplomové práce.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Chuťový pohárek. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Peterberg (Florida): Wikipedia Foundantion, Stránka byla naposledy editována 9. 2. 2012 v 09:21[cit. 2012-03-20].  
Dostupné z:  
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Chu%C5%A5ov%C3%BD\\_poh%C3%A1rek](http://cs.wikipedia.org/wiki/Chu%C5%A5ov%C3%BD_poh%C3%A1rek)
- [2] DOLEŽAL, Martin. Sladidla používaná ve farmacii a potravinářství. *Praktické lékárenství: časopis postgraduálního vzdělávání pro farmaceuty* [online]. Přírodní sladidla. Farmaceutická fakulta, Hradec Králové: 2008, roč. 4, č. 6, s. 306-307 [cit. 2012-02-01]. ISSN: 1801-2434. Dostupné také z:  
<http://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200806-0009.php>
- [3] STRATIL, P. *Chuťové látky* [elektronická skripta].[cit. 2012-03-20] Mendelova univerzita Brno, s. 288-305. Dostupné z: [http://share.centrax.cz/CPO-9-11\\_Chutove\\_latky,\\_str\\_288-305.pdf](http://share.centrax.cz/CPO-9-11_Chutove_latky,_str_288-305.pdf)
- [4] LEŽÁKOVÁ, Jana. *Netradiční přírodní rostlinná sladidla* [online]. Zlín, 2010 [cit. 2012-04-17]. Dostupné také z: <http://dspace.k.utb.cz/handle/10563/14232>.  
Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta. Vedoucí bakalářské práce Daniela Kramářová.
- [5] KINGHORN, A. et al., Intense Natural Sweeteners. *Inc. Med Res Rev* [online]. Sep 1998, vol. 18, iss. 5, s. 347-360 [cit. 2012-03-14]. Dostupný z <http://www.scribd.com/doc/38725126/Noncariogenic-Intense-Natural-Sweeteners>
- [6] ČESKO. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. Vyhláška č. 4/2008 Sb. ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, Příloha 5: seznam sladidel povolených při výrobě potravin a skupin potravin a podmínky jejich použití. In: Sbíрка zákonů České republiky. 2012.

Dostupný z: <http://eagri.cz/public/eagri/legislativa/ostatni/100065005.html>

- [7] ČESKO. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích. In: Sbírkka zákonů České republiky. Dostupné z: <http://www.epravo.cz/top/zakony/sbirka-zakonu/zakon-ze-dne-24-dubna-1997-o-potravinach-a-tabakovych-vyrobcich-a-ozmene-a-doplneni-nekterych-souvisejicich-zakonu-3893.html>
- [8] LEBL, Jan, Štěpánka PRŮHOVÁ a Zdeněk ŠUMNÍK. *Abeceda diabetu: příručka pro děti, mladé dospělé a jejich rodiče*. 2. přeprac. a rozšíř. vyd. Praha: Maxdorf, 2004. s. 184. ISBN 80-7345-022-4.
- [9] PELIKÁNOVÁ, T. a V. BARTOŠ. *Diabetes mellitus: minimum pro praxi*. Praha: Triton, 1999. s. 179. ISBN 80-7254-020-3.
- [10] KROGER, M., K. MEISTER a R. Kava. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes. *Comp Rev Food Sci Food Safety*. A review of the safety issues [online]. 2006, 5, s. 35-47 [cit. 2012-02-03]. Doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x.  
Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x/abstract>
- [11] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, vol. 28, iss. 9 [cit. 2012-04-17]. Doi: 10.1016/j.trac.2009.06.008.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609001381>
- [12] DOSSI, N. et al., Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. *Chromatographia* [online]. 2006, vol. 63, No. 11/12, s. 557-562 [cit. 2012-01-15]. Doi: 10.1365/s10337-006-0793-y.

Dostupné z: <http://www.deepdyve.com/lp/springer-journals/simultaneous-rp-lc-determination-of-additives-in-soft-drinks-pJFHKSVMnn>

[13] Pijtezdravouvodu.cz: *O vodě* [online]. © 2009-2012 [cit. 2012-02-02]. Dostupné z: <http://www.pijtezdravouvodu.cz/o-vode/>

[14] ČESKO. Zákon č. 164/2001 Sb., ze dne 13. dubna 2001 o přírodních léčivých zdrojích, zdrojích přírodních minerálních vod, přírodních léčebných lázních a lázeňských místech a o změně některých souvisejících zákonů (lázeňský zákon). In: Sbíрка zákonů České republiky. 2001, částka 64, s. 1-31. Dostupný z: <http://eagri.cz/public/eagri/legislativa/ostatni/100065005.html>

[15] ČESKO. Vyhláška č. 423/2001 Sb., ze dne 6. 12., kterou se stanoví způsob a rozsah hodnocení přírodních léčivých zdrojů a zdrojů přírodních minerálních vod a další podrobnosti jejich využívání, požadavky na životní prostředí a vybavení přírodních léčebných lázní a náležitosti odborného posudku o využitelnosti přírodních léčivých zdrojů a klimatických podmínek k léčebným účelům, přírodní minerální vody k výrobě přírodních minerálních vod a o stavu životního prostředí přírodních léčebných lázní (vyhláška o zdrojích a lázních). In: Sbíрка zákonů České republiky. 2001, částka 159.

Dostupný z:

<http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?sn=y&hledany=423%2F2001&zdroj=sb01423&cd=76&typ=r>

[16] Minerální voda. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Peterberg (Florida): Wikipedia Foundation, stránka byla naposledy editována 9. 2. 2012, [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Mineralni\\_voda](http://cs.wikipedia.org/wiki/Mineralni_voda)

[17] Fenylylketonurie. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Peterberg (Florida): Wikipedia Foundation, stránka byla naposledy editována 9. 2. 2012 v 19:53 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylylketonurie>

- [18] KLESCHT, Vladimír, Iva HRNČIŘÍKOVÁ a Lucie MANDELOVÁ. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. s. 108. ISBN 80-251-1292-6.
- [29] DOLEŽAL, Martin. Sladidla používaná ve farmacii a potravinářství. *Praktické lékárenství: časopis postgraduálního vzdělávání pro farmaceuty*. Syntetická sladidla. Praha: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009, roč. 5, č. 1, s. 29-31. ISSN: 1801-2434. Dostupný také z:  
<http://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200901-0007.php>
- [20] CANTARELLI, M. A. et al. Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115, 1128–1132, [cit. 2012-01-15].  
Doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.101
- [21] GOUGEON, Réjeanne, Mark SPIDEL, Kristy LEE a Catherine FIELD. Canadian diabetes association national nutrition committee technical review. *Canadian journal of diabetes*. Non-nutritive intense sweeteners in diabetes management [online]. 2004, vol. 28, iss. 4, s. 385-399 [cit. 2012-02-02]. Dostupné z:  
[http://www.diabetes.ca/documents/for-professionals/CJD--June\\_2010--Hsu.pdf](http://www.diabetes.ca/documents/for-professionals/CJD--June_2010--Hsu.pdf)
- [22] SIZER, F., E. WHITNEY. *Nutrition: Concepts and controversies*. 9. vydání. Belmont: Wadsworth, 2003. 10<sup>th</sup> edition, s. 589. ISBN-10: 0534645062, ISBN-13: 978-0534645069.
- [23] MAGNUSON, B. A. et al., Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2007, vol. 37, iss. 8, s. 629–727 [2012-02-02]. ISSN: 1040-8444 print / 1547-6898 online. Doi: 10.1080/10408440701516184. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10408440701516184>

- [24] BROWN, Judith. E. *Nutrition now*. 5. vydání. Belmont: Wadsworth, 2008. Publication Date May 1, 2007. Edition 5, s. 696. ISBN-10: 0495388823, ISBN-13: 978-0495388821. ISBN 0-495-11769-2.
- [25] THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Report of the meetings on aspartame with national experts. Question number: EFSA-Q-2009-00488. 2009, s. 64. ON-1641 Noted at the 36<sup>th</sup> Advisory Forum Meeting, 19-20 May, 2010. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/1641.pdf>
- [26] SOFFRITTI, Morando, Fiorella BELPOGGI, Davide Degli ESPOSTI et al., First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administered in the Feed to Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives* [online]. March 2006, vol. 114, iss. 3, s. 379 [cit. 2012-04-17]. Doi: 10.1289/ehp.8711. Dostupné z: <http://www.ehponline.org/ambra-doi-resolver/10.1289/ehp.8711>
- [27] SOFFRITTI, Morando, Fiorella BELPOGGI, Eva TIBALDI et al., Life-Span Exposure to Low Doses of Aspartame Beginning during Prenatal Life Increases Cancer Effects in Rats. *Environ Health Perspect* [online]. Received: 16 March 2007, Accepted: 13 June 2007, Online: 13 June 2007, vol. 115, iss. 9., s. 1293 [cit. 2012-02-01]. Doi:10.1289/ehp.10271. Dostupné z: <http://ehp03.niehs.nih.gov/article/info:doi/10.1289/ehp.10271>
- [28] EFSA. Updated opinion on a request from the European Commission related to the 2<sup>nd</sup> ERF carcinogenicity study on aspartame, taking into consideration study data submitted by the Ramazzini Foundation in February 2009. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. (EFSA-Q-2009-00474). *The EFSA Journal* [online]. 2009, Adopted on 19 March 2009, published on 20 April 2009, 1015, s. 1-18 [cit. 2012-02-02]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1015.pdf>

- [29] GEISLER, C., POWERS, H. Human nutrition. 11. vydání. New York: Elsevier, 2005, s. 36-37, ISBN 0-443-07356-2.
- [30] CATALDO, C. B., L. K. DE BRUGNE a E. N. WHITNEY. Nutrition and diet therapy: principles and practice. Belmont: Wadsworth, 2003. 6<sup>th</sup> edition, s. 40-43. ISBN 0-534-57691-5.
- [31] BANDYOPADHYAY, A., S. GHOSHAL a A. MUKHERJEE. Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2008, vol. 31, iss. 4, s. 447-458 [cit. 2012-03-14]. ISSN: 0148-0545. Dostupný z: <http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&hid=112&sid=ef88e195-397e-47ae-8bf0-a72a6e20cdf5%40sessionmgr114>
- [32] ILLBÄCK, N. G. et al. Estimated intake of the artificial sweeteners acesulfame-K, aspartame, cyclamate and saccharin in a group of Swedish diabetics. *Food additives and contaminants*, 2003, vol. 20, iss. 2, s. 99-114.
- [33] KVASNIČKOVÁ, A. Posuzování zdravotní nezávadnosti potravinářských aditiv a stanovení jejich akceptovatelného denního příjmu. ICBP: Potravinářská aditiva [online]. © 2011. [cit. 2012-07-08]. Dostupné z: [http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kvasnickova/5\\_Stanoveni\\_ADI.pdf](http://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kvasnickova/5_Stanoveni_ADI.pdf)
- [34] GARNIER-SAGNE, I., J. C., LEBLANC, P. VERGER. Calculation of the intake of three intense sweeteners in young insulin-dependent diabetics. *Food and chemical toxicology* [online]. Jul 2001, vol. 39, iss. 7, s. 745-749 [cit. 2012-02-02].

- [35] AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American dietetic association: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American dietetic association* [online]. Februar 2004, vol. 104, iss. 6, s. 255-275 [cit. 2012-01-02]. Doi: 0.1016/j.jada.2003.12.001.
- [36] WOOD, Roger, Lucy FOSTER, Andrew DAMANT a Pauline KEY. *Analytical methods for food additives*. Woodhead a CRC Press LLC, © 2004, Woodhead, 2004, s. 273, kapitola 26. ISBN 1 85573 722 1 (book) 1 85573 772 8 (e-book), CRC Press ISBN 0-8493-2534-X, CRC Press order number: WP2534.
- [37] LAWRENCE, J. F. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. vydání, Canada: Academic Press, 2003, s. 6406 s, second Edition. Editors: Luiz Trugo and Paul M. Finglas. ISBN: 978-0-12-227055-0.
- [38] IOP, S. C. F., R. S. F. SILVA, A. P. BELEIA. Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. *Food Chemistry* [online]. 1999, vol. 66, iss. 2, s. 167-171 [cit. 2011-11-02]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698002593>
- [39] GREENLY, L. A doctor's guide to sweeteners. *Journal of chiropractic medicine* [online]. 2003, vol. 2, iss. 2, s. 80-86 [cit. 2011-11-02]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646965/pdf/main.pdf>
- [40] RENWICK, A. G. et al. The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration. *Toxicology and applied pharmacology* [online]. Received 10 December 2003, accepted 21 January 2004, vol. 196, iss. 3, s. 367-380 [cit. 2011-11-02]. Doi: 10.1016/j.taap.2004.01.013. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X04000675>
- [41] GROTZ, V. Lee a Ian C. MUNRO. An overview of the safety of sucralose. *Toxicology and Pharmacology* [online]. Received 5 March 2009. Available online 21

May 2009. 2005, vol. 55, iss. 1, s. 1-5 [cit. 2011-05-14].  
Doi:10.1016/j.yrtph.2009.05.011.

Dostupný z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230009000786>

- [42] Sukralóza - sladidlo nové generace. *Agfoods.eu* [online]. [cit. 2012-01-10]. Dostupné z: <http://www.agfoods.eu/sukraloza-88>
- [43] Sukralóza - marketingový trik nebo skutečnost? *Vareni.cz* [online]. © 2000 - 2012 [cit. 2012-01-10]. Dostupné z: <http://clanky.vareni.cz/sukraloza-marketingovy-trik-nebo-skutecnost/>
- [44] FERRER, I. a E. THURMAN. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. Available online 20 February 2010, © 2010 Elsevier, 1217, s. 4127-4134 [cit. 2012-01-10]. Doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.020
- [45] Chromatografické metody. © 2007. Lékařská fakulta UK v Hradci Králové. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/>
- [46] CHURÁČEK, J. a P. JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná chromatografie*. Určeno pro posluchače katedry analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Praha: SNTL, 1986, s. 140.
- [47] HPLC. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Peterberg (Florida): Wikipedia Foundantion, stránka byla naposledy editována 21. 2. 2012, [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>



- [48] Chromatografie. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. St. Peterberg (Florida): Wikipedia Foundantion, stránka byla naposledy editována 9. 2. 2012, [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>
- [49] LoBRUTTO, Rosario a Yuri KAZAKEVICH. *HPLC for Pharmaceutical scientists*. New Jersey: Willey & Sons, 2007. ISBN-13: 978-0-471-68162-5.
- [50] Simulation Addresses Band-Broadening in HPLC Systems. Dostupné na: [http://www.comsol.com/stories/waters\\_corp\\_hplc\\_systems/full/](http://www.comsol.com/stories/waters_corp_hplc_systems/full/) [online 2012-02-02]
- [51] KREJČÍ, Miloš, PAJUREK Jan, KOMERS Radko et al. *Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii*. Praha: SNTL, 1990. s. 206. ISBN 80-03-00403-9
- [52] DOUŠA, Michal. HPLC. *HPLC.cz* [online]. ©1999-2011 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [53] Asymetrie píku. Dostupné na: [http://www.hplc.cz/Tip/asymm\\_factor.htm](http://www.hplc.cz/Tip/asymm_factor.htm)
- [54] An HPLC Analysis of Sweeteners in Beverages, s. 1-5, Version 1.0. CHEM 311L. Quantitative Analysis Laboratory. Dostupné z: [info-host.nmt.edu/~jaltig/HPLC.pdf](http://info-host.nmt.edu/~jaltig/HPLC.pdf)
- [55] WASIK, Andrzej, Josephine McCOURT a Manuela BUCHGRABER. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection - Development and single-laboratory validation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007. Elsevier, 1157, s. 187–196 [2012-03-16]. Received 13 March 2007, received in revised form 25 April 2007, accepted 27 April 2007, Available online 6 May 2007. Doi:10.1016/j.chroma.2007.04.068

- [56] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK, Agata KOT-WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* [online]. Received: 14 February 2011, Revised: 9 March 2011, Accepted: 20 March 2011. Doi: 10.1007/s00216-011-4937-z
- [57] ÇUBUK DEMIRALAY, E. et al. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia* [online]. January 2006, 63, 1/2, [cit. 2012-01-15]. Doi: 10.1365/s10337-005-0683-80009-5893/06/01
- [58] Konzervace a balení potravin. Distanční text. Cepac Morava: © 2007, Projekt OP RLZ Opatření 3.2-0309, s. 158

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ACS-K	Acesulfam K
ASP	Aspartam
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Kapalinová chromatografie
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography Vysoce účinná kapalinová chromatografie
ADI	Acceptable Daily Intake Doporučená denní přijatelná dávka
WHO	World Health Organization Světová zdravotnická organizace
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations Světová organizace pro výživu
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Sdružení odborníků pro potravinář. přídat. l. zahrnující členy z FAO a WHO
EFSA	European Food Safety Authority Evropská potravinová bezpečnostní agentura
CC	Column Chromatography Kolonová chromatografie
PP	Paper Chromatography Papírová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography Chromatografie na tenké vrstvě
GC	Gas Chromatography Plynová chromatografie

---

SFC	Supercritical Fluid Chromatography Fluidní chromatografie
LSC	Liquid-Solid Chromatography Adsorpční chromatografie
LLC	Liquid-Liquid Chromatography Rozdělovací (adsorpční) chromatografie
GPC	Gel Permeation Chromatography Gelová (permeační) chromatografie
IEC	Ion-Exchange Chromatography Iontová chromatografie
CZE	Capillary Zone Electrophoresis Kapilární zónová elektroforéza
FIA	Flow Injection Analysis Průtoková injekční analýza
FTIR	Fourier transform infrared (spectroscopy) Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
NP-HPLC	Normal Phase - High Performance Liquid Chromatography Kapalinová chromatografie na normálních fázích
RP-HPLC	Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography Kapalinová chromatografie na obrácených (reverzních) fázích
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet Kapalinová chromatografie s UV detekcí
Syringe	Stříkačkový (filtr)
SPE	Solid Phase Extraction Extrakce tuhou fází

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Pramenitá voda slazená fruktózou.....	17
Obrázek 2 Minerální voda slazená cukrem.....	19
Obrázek 3 Schéma kapalinového chromatografu [50] .....	26
Obrázek 4 Asymetrie píku a tailing faktor [53].....	29
Obrázek 5 Chromatogram devíti analyzovaných umělých sladidel. ....	32
Obrázek 6 HPLC Dionex Ultimate 3000.....	33
Obrázek 7 Kalibrační křivka pro stanovení acesulfamu K.....	43
Obrázek 8 Kalibrační křivka pro stanovení aspartamu.....	44
Obrázek 9 Standard acesulfam K o koncentraci 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .....	80
Obrázek 10 Standard aspartam o koncentraci 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .....	81
Obrázek 11 Směs standardů acesulfamu K a aspartamu .....	82
Obrázek 12 Chromatogram devíti analyzovaných umělých sladidel [56].....	84
Obrázek 13 Vzorek A3 .....	85
Obrázek 14 Vzorek B3 .....	86
Obrázek 15 Vzorek C2 po přidavku standardu ACS-K.....	87
Obrázek 16 V chromatografech pod sebou: kyselina benzoová, kyselina sorbová, vzorek C2. ....	88
Obrázek 17 Vzorek D1 po přidavku ACS-K. ....	89
Obrázek 18 V chromatografech pod sebou: vzorek D2, kyselina benzoová. ....	90

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Vybraná přírodní sladidla a jejich stupeň sladivosti [4] .....	14
Tabulka 2 Nejčastěji používaná umělá sladidla v nápojích [4] .....	14
Tabulka 3 Dva druhy HPLC, jejich stacionární a mobilní fáze [46,47,49] .....	27
Tabulka 4 Kalibrace acesulfamu K při vlnové délce 220 nm.....	45
Tabulka 5 Kalibrace aspartamu při vlnové délce 210 nm .....	46
Tabulka 6 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A1 .....	47
Tabulka 7 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A1 .....	47
Tabulka 8 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A2.....	48
Tabulka 9 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A2 .....	48
Tabulka 10 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku A3 .....	49
Tabulka 11 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku A3 .....	49
Tabulka 12 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B1 .....	50
Tabulka 13 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B1.....	50
Tabulka 14 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B2 .....	51
Tabulka 15 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B2.....	51
Tabulka 16 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku B3 .....	52
Tabulka 17 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku B3.....	52
Tabulka 18 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C1 .....	53
Tabulka 19 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C1.....	53
Tabulka 20 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C2 .....	54
Tabulka 21 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C2.....	54
Tabulka 22 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku C3 .....	55
Tabulka 23 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku C3.....	55
Tabulka 24 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D1 .....	56
Tabulka 25 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D1 .....	56
Tabulka 26 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D2.....	57
Tabulka 27 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D2 .....	57
Tabulka 28 Obsah acesulfamu K a aspartamu ve vzorku D3 .....	58
Tabulka 29 Průměrný obsah ACS-K a ASP ve vzorku D3 .....	58

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Chromatogram standardu ACS-K

Příloha P II: Chromatogram standardu ASP

Příloha P III: Chromatogram směsi standardů ACS-K a ASP

Příloha P IV: Souhrnná tabulka s kódováním vzorků, průměrným obsahem a složením

Příloha P V: Chromatogram devíti analyzovaných sladidel [56]

Příloha P VI: Chromatogram vzorku A3

Příloha P VII: Chromatogram vzorku B3

Příloha P VIII: Chromatogram vzorku C2

Příloha P IX: Chromatogramy kyseliny benzoové, sorbové a vzorku C2

Příloha P X: Chromatogram vzorku D1

Příloha P XI: Chromatogram vzorku D2 a kyseliny benzoové

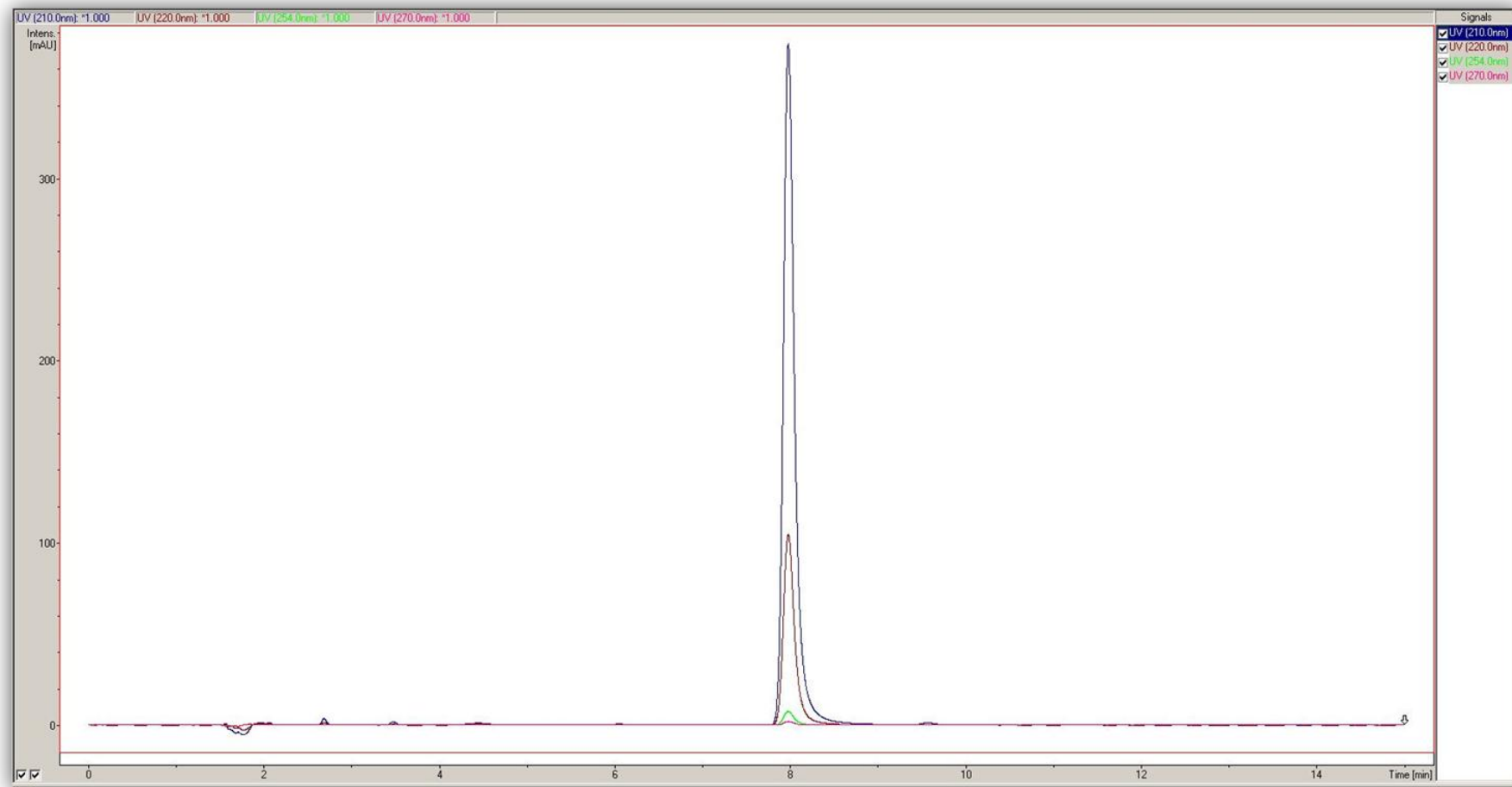
## PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANDARDU ACS-K



Obrázek 9 Standard acesulfam K o koncentraci  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

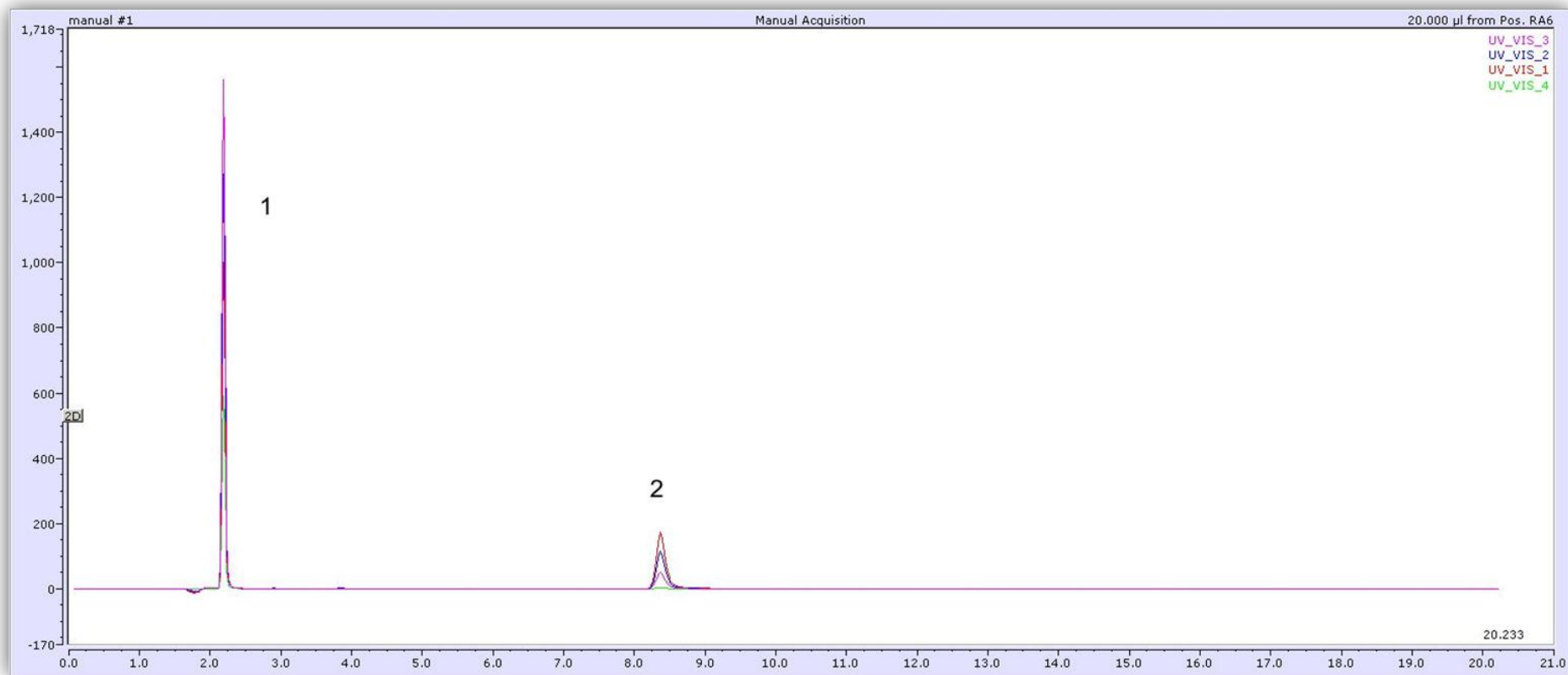


## PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM STANDARDU ASP



Obrázek 10 Standard aspartam o koncentraci  $80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

## PŘÍLOHA P III: CHROMATOGRAM SMĚSI STANDARDŮ ACS-K A ASP

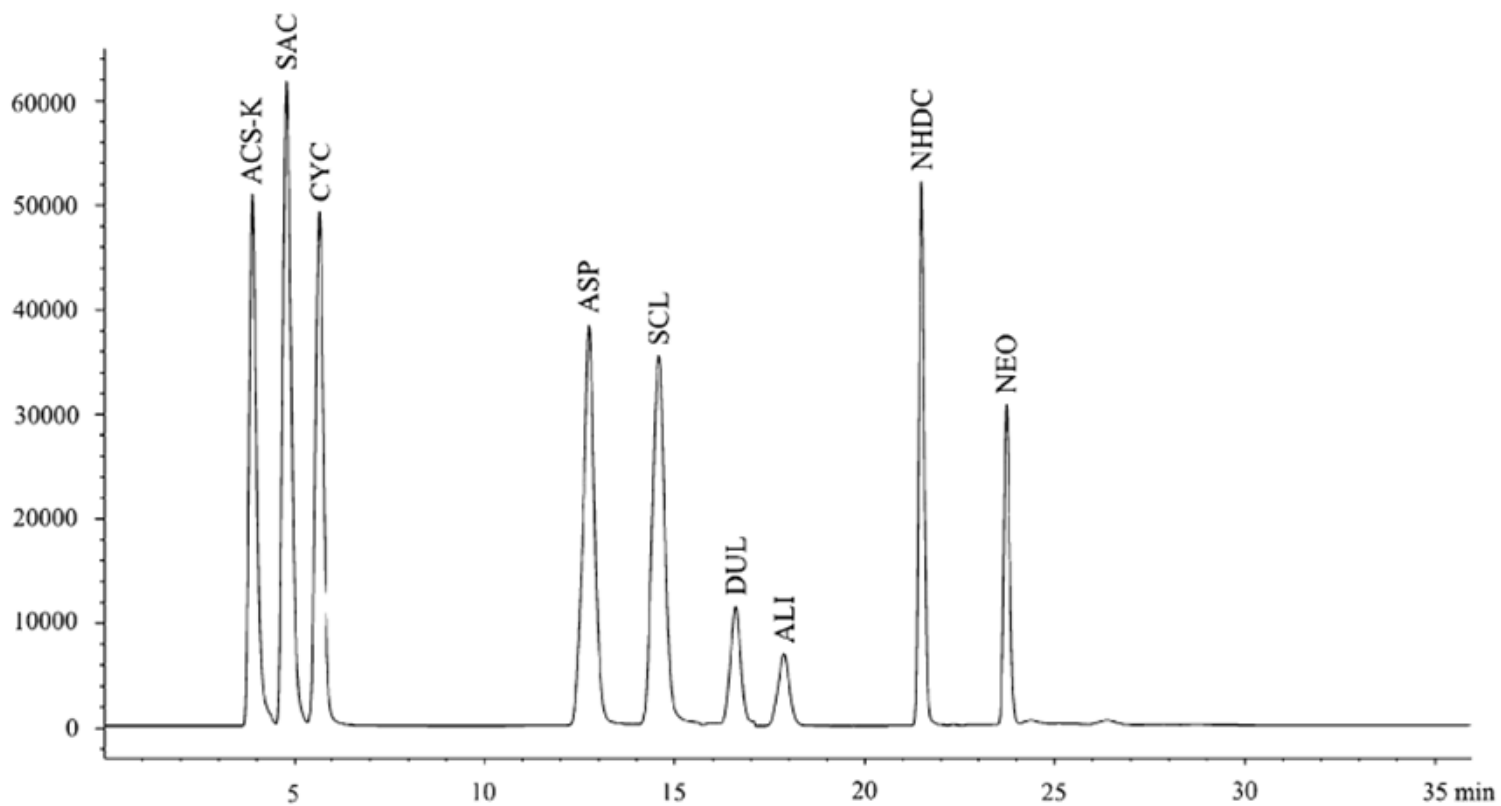


Obrázek 11 Směs standardů acesulfamu K a aspartamu. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP

## PŘÍLOHA P IV: SOUHRNNÁ TABULKA S KÓDOVÁNÍM VZORKŮ, PRŮMĚRNÝM OBSAHEM A SLOŽENÍM

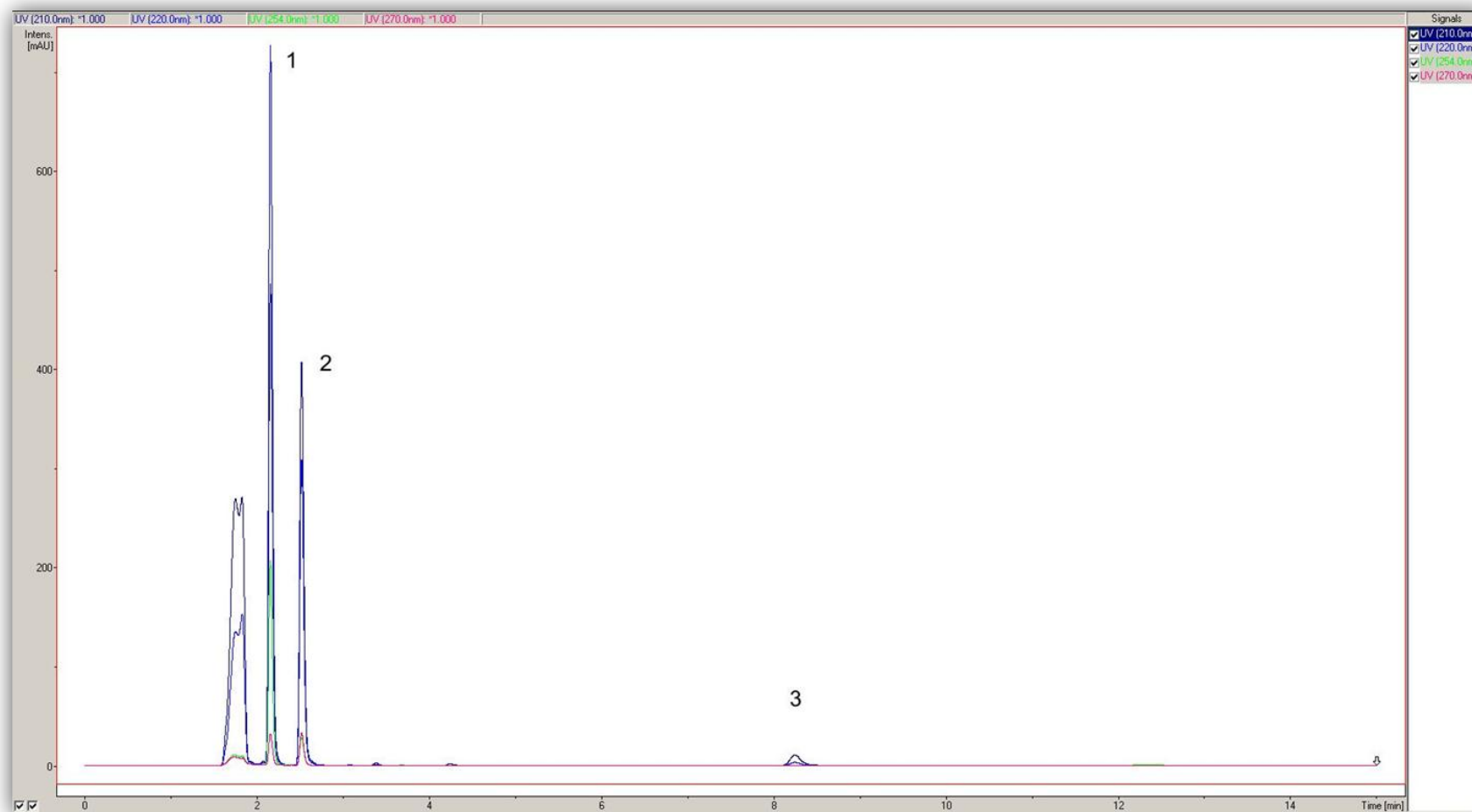
Kód vzorku	Průměrný obsah ACS-K [mg.l <sup>-1</sup> ]	Průměrný obsah ASP [mg.l <sup>-1</sup> ]	Složení vzorku
A1	1,49 ± 0,01	1,60 ± 0,06	pramenitá voda, invertovaný cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam
A2	1,68 ± 0,01	2,54 ± 0,01	pramenitá voda, invertovaný cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam
A3	1,58 ± 0,02	2,01 ± 0,01	pramenitá voda, invertovaný cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, cyklamát sodný, sacharin, acesulfam K, aspartam
B1	54,68 ± 0,06	18,66 ± 0,03	minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová,
B2	57,68 ± 0,10	21,74 ± 0,04	minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová
B3	57,42 ± 0,04	7,94 ± 0,04	minerální voda, cukr, aspartam, acesulfam K, aroma, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová,
C1	24,49 ± 0,04	22,53 ± 0,03	přírodní minerální voda, cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 a E 211, aspartam, acesulfam K
C2	24,28 ± 0,02	20,96 ± 0,02	přírodní minerální voda, cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 a E 211, aspartam, acesulfam K
C3	46,42 ± 0,06	21,62 ± 0,01	přírodní minerální voda, cukr, CO <sub>2</sub> , kyselina citronová, aroma, konzervanty E 202 a E 211, aspartam, acesulfam K
D1	51,84 ± 0,01	50,11 ± 0,01	minerální voda, kyselina citronová, CO <sub>2</sub> , aroma, acesulfam K, aspartam
D2	56,07 ± 0,15	49,88 ± 0,14	minerální voda, kyselina citronová, aroma, konzervant benzoát sodný, acesulfam K, aspartam
D3	59,89 ± 0,07	51,25 ± 0,02	minerální voda, kyselina citronová, citronan sodný, CO <sub>2</sub> , rozpustná vláknina, L-karnitin, aroma, aspartam, acesulfam K.

## PŘÍLOHA P V: CHROMATOGRAM DEVÍTI ANALYZOVANÝCH SLADIDEL [56]



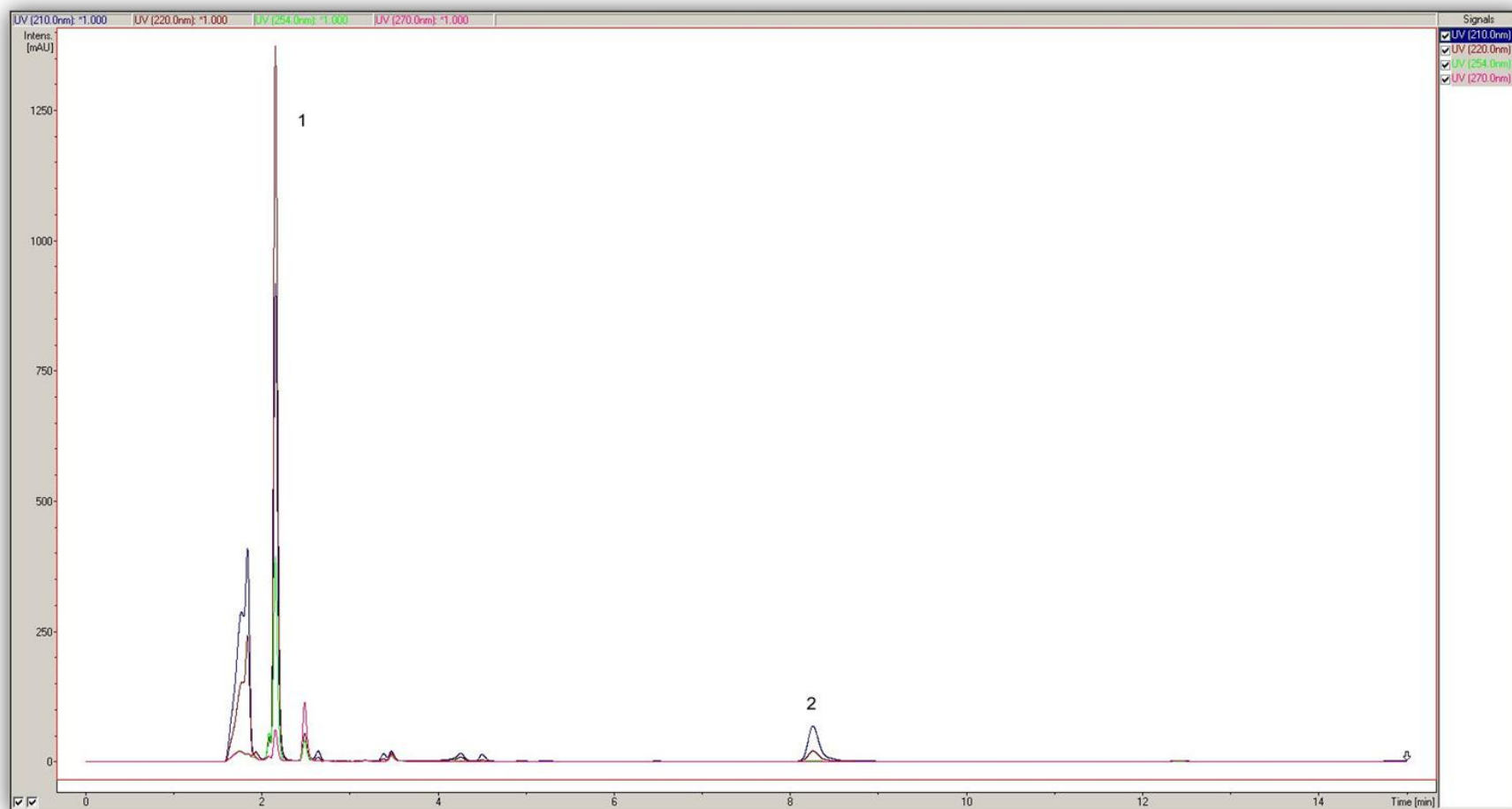
Obrázek 12 Chromatogram devíti analyzovaných umělých sladidel. Pozn. SAC = sacharin, CYC = cyklamát, SCL = sukralóza, DUL = dulcin, ALI = alitam, NHDC = neohesperidin dihydrochalkon, NEO = neotam [56].

## PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAM VZORKU A3



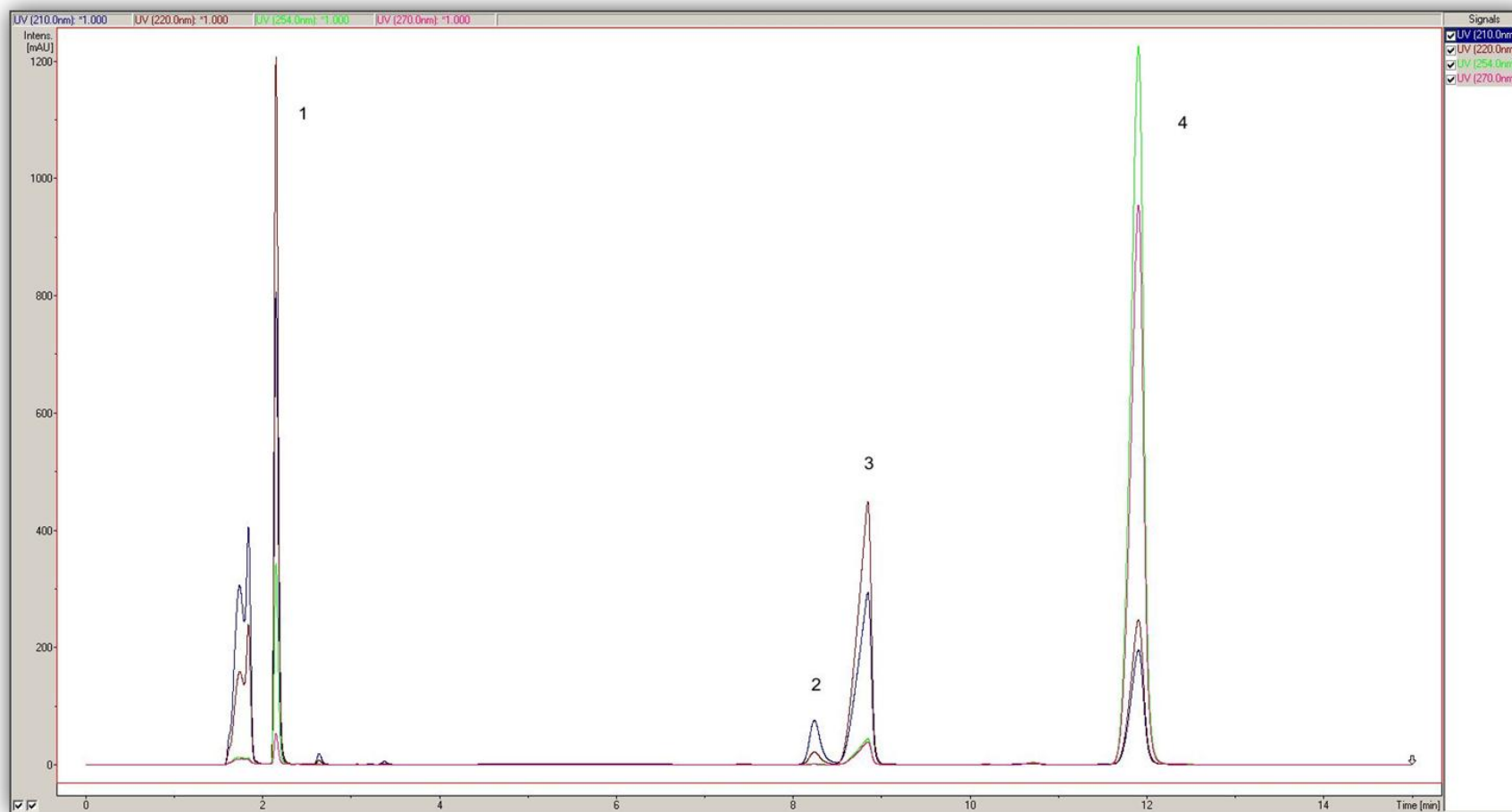
Obrázek 13 Vzorek A3. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = sacharin, 3 = ASP

## PŘÍLOHA P VII: CHROMATOGRAM VZORKU B3



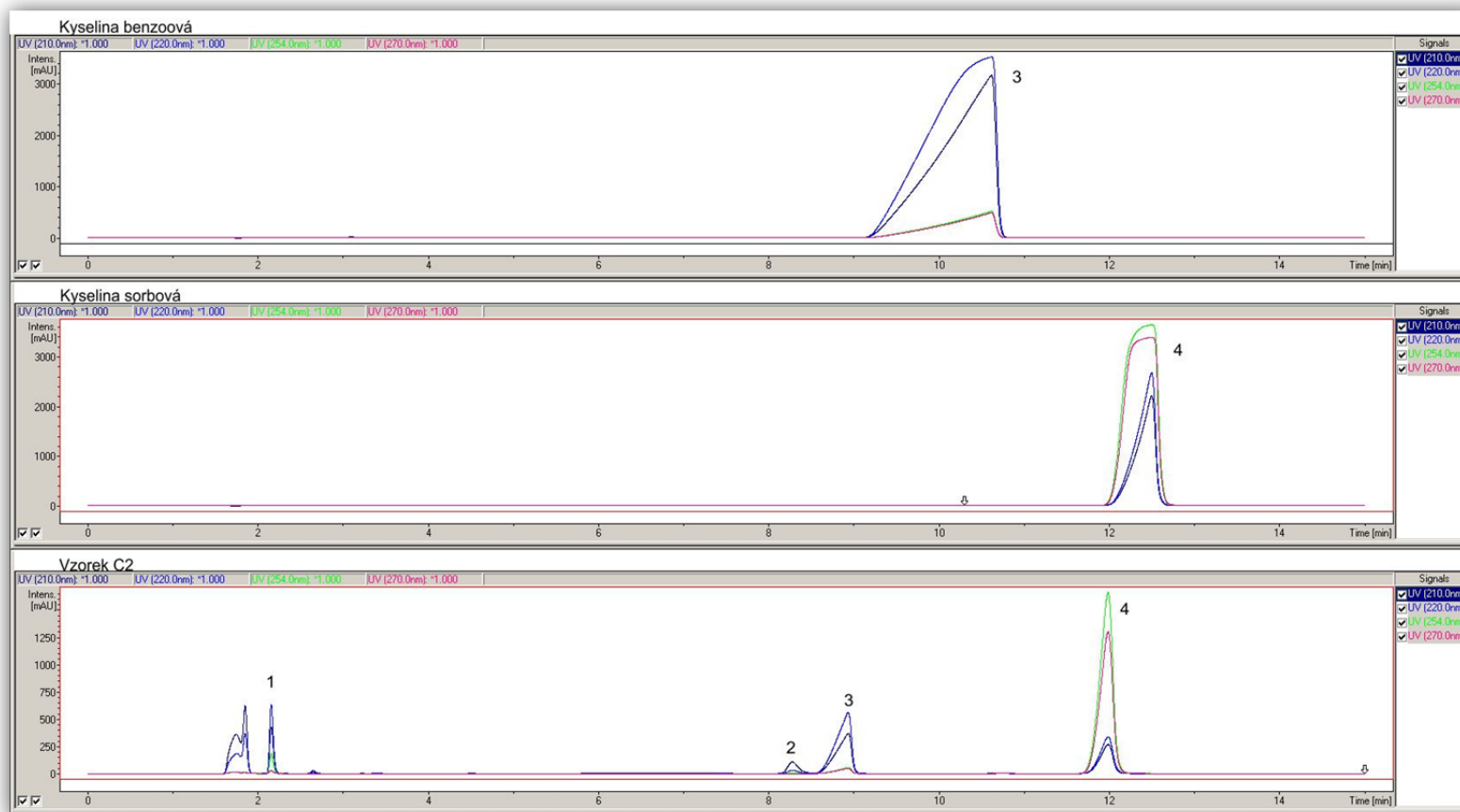
Obrázek 14 Vzorek B3. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP

## PŘÍLOHA P VIII: CHROMATOGRAM VZORKU C2



Obrázek 15 Vzorek C2 po přidavku standardu ACS-K. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP, 3 = benzoová kyselina, 4 = sorbová kyselina

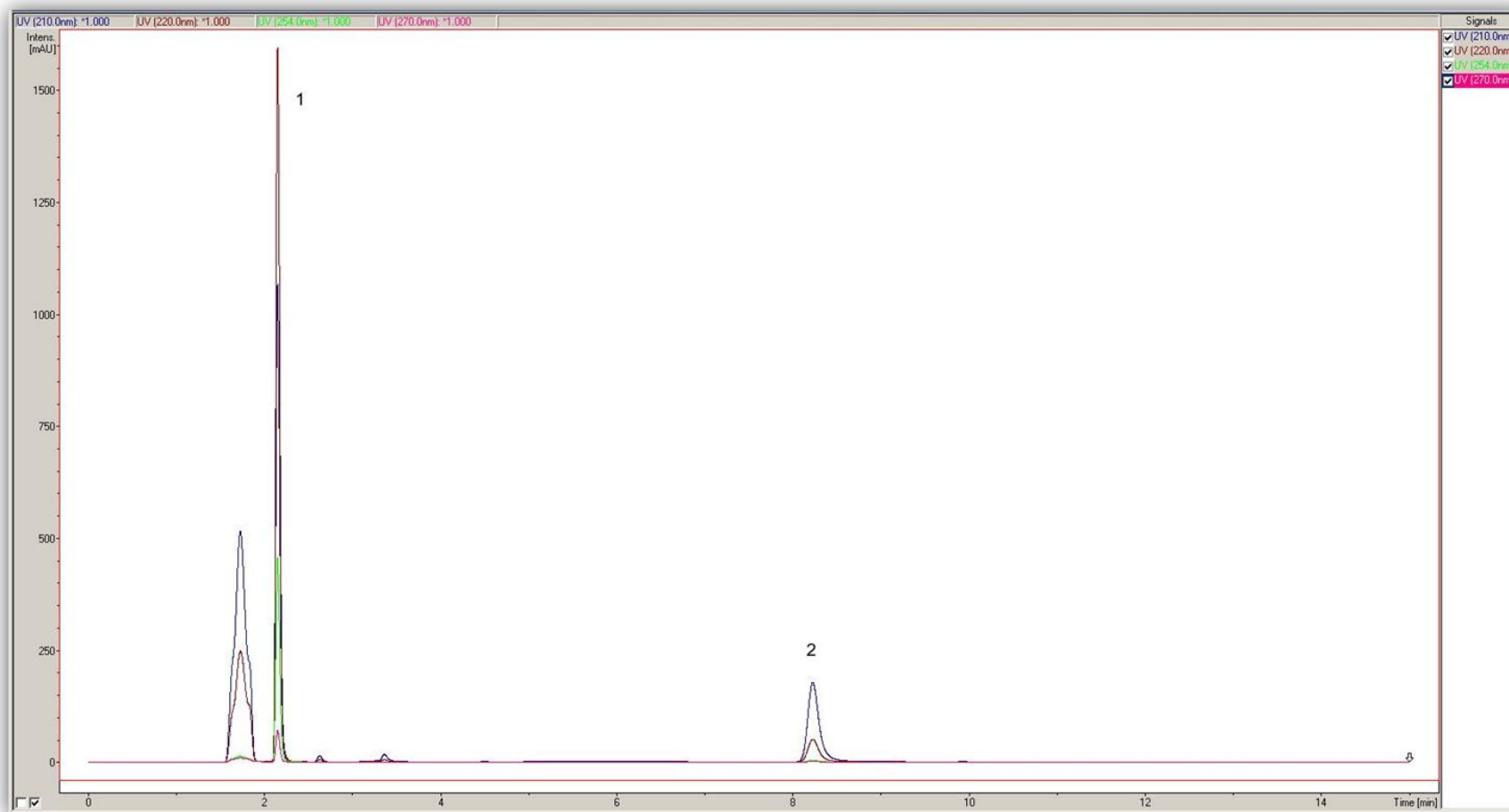
## PŘÍLOHA P IX: CHROMATOGRAMY KYSELINY BENZOOVÉ, KYSELINY SORBOVÉ A VZORKU C2



Obrázek 16 V chromatogramech pod sebou: kyselina benzoová, kyselina sorbová, vzorek C2. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP, benzoová kyselina = 3, sorbová kyselina = 4

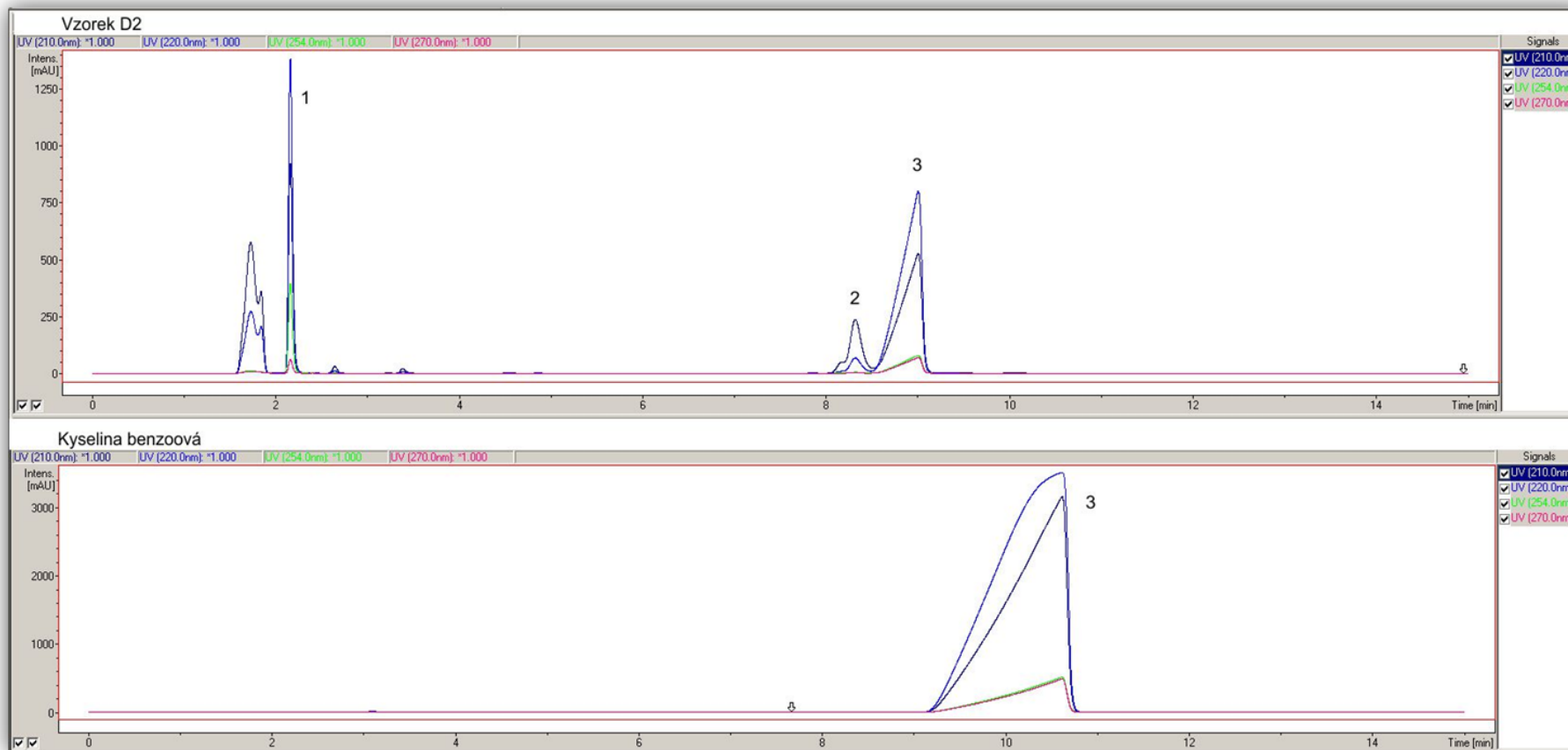


## PŘÍLOHA P X: CHROMATOGRAM VZORKU D1



Obrázek 17 Vzorek D1 po přidavku ACS-K. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP

## PŘÍLOHA P XI: CHROMATOGRAM VZORKU D2 A KYSELINY BENZOOVÉ



Obrázek 18 V chromatografch pod sebou: vzorek D2, kyselina benzoová. Pozn. 1 = ACS-K, 2 = ASP, 3 = kyselina benzoová