

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Tomáš Škop

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Využití chromatografických technik pro analýzu umělých sladidel

Tomáš Škop

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tomáš Škop**
Osobní číslo: **C17334**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Využití chromatografických technik pro analýzu umělých sladidel**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na vlastnosti, využití a fyziologické účinky umělých sladidel. Dále se věnujte možnostmi jejich analytického stanovení, zejména s využitím chromatografických technik.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití chromatografických technik pro analýzu umělých sladidel jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 6. 2021

Tomáš Škop

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné připomínky, které mi při vypracování bakalářské práce poskytla. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením umělých sladidel pomocí chromatografických technik. První část je věnována obecné charakteristice sladidel. Druhá část je zaměřena na vlastnosti, fyziologické účinky a využití umělých sladidel. Ve třetí části jsou popsány chromatografické techniky použité při stanovení umělých sladidel a následně jsou porovnány.

KLÍČOVÁ SLOVA

Umělá sladidla, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie

TITLE

Chromatographic techniques in analysis of artificial sweeteners

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with determination of artificial sweeteners by chromatographic techniques. The first part is devoted to general characteristics of sweeteners. The second part is focused on the properties, physiological effects and the application of artificial sweeteners. In the third part, the chromatographic techniques that were used in the determination of artificial sweeteners are described and compared.

KEYWORDS

Artificial sweeteners, liquid chromatography, gas chromatography

1	ÚVOD	13
2	OBECNÁ CHARAKTERISTIKA SLADIDEL	14
2.1	KLASIFIKACE SLADIDEL	14
2.2	ENERGETICKÁ HODNOTA	14
2.2.1	<i>Původ</i>	<i>15</i>
2.2.2	<i>Sladivost</i>	<i>15</i>
2.2.3	<i>Chemická struktura</i>	<i>15</i>
2.2.4	<i>Bezpečnost a regulace sladidel</i>	<i>16</i>
2.3	AKCEPTOVATELNÝ DENNÍ PŘÍJEM	16
3	UMĚLÁ SLADIDLA	18
3.1	ACESULFAM K (E 950)	18
3.1.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Využití</i>	<i>18</i>
3.2	ASPARTAM (E951)	19
3.2.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Využití</i>	<i>20</i>
3.3	CYKLAMÁT (E952)	21
3.3.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>21</i>
3.3.2	<i>Využití</i>	<i>21</i>
3.4	SACHARIN (E954)	22
3.4.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>22</i>
3.4.2	<i>Využití</i>	<i>23</i>
3.5	SUKRALÓZA (E955)	23
3.5.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>24</i>
3.5.2	<i>Využití</i>	<i>24</i>
3.6	NEOHESPERIDIN DIHYDROCHALKON (E959)	24
3.6.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>25</i>
3.6.2	<i>Využití</i>	<i>25</i>
3.7	NEOTAM (E961)	26
3.7.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>26</i>
3.7.2	<i>Využití</i>	<i>27</i>
3.8	ADVANTAM (E969)	27
3.8.1	<i>Fyziologické účinky</i>	<i>28</i>
3.8.2	<i>Využití</i>	<i>28</i>
4	CHROMATOGRFICKÉ METODY PRO ANALÝZU UMĚLÝCH SLADIDEL	29
4.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	29

4.1.1	<i>Instrumentace</i>	29
4.1.2	<i>Systémy v HPLC</i>	31
4.1.3	<i>Vybraná HPLC stanovení</i>	32
4.2	TENKOVSTVÁ CHROMATOGRFIE	35
4.2.1	<i>Instrumentace</i>	36
4.2.2	<i>Vybraná HPTLC stanovení</i>	36
4.3	PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE	37
4.3.1	<i>Instrumentace</i>	37
4.3.2	<i>Vybraná GC stanovení</i>	39
5	ZÁVĚR	40
6	POUŽITÁ LITERATURA	40

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace sladidel	14
Obrázek 2: Strukturní vzorec acesulfamu K.....	18
Obrázek 3: Strukturní vzorec aspartamu	19
Obrázek 4: Strukturní vzorec cyklamátu	21
Obrázek 5: Strukturní vzorec sacharinu.....	22
Obrázek 6: Strukturní vzorec sukralózy	24
Obrázek 7: Strukturní vzorec neohesperidin dihydrochalkonu	25
Obrázek 8: Strukturní vzorec neotamu	26
Obrázek 9: Strukturní vzorec advantamu	28
Obrázek 10: Schéma vysokoúčinného chromatografu	30
Obrázek 11: Schéma plynového chromatografu.....	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Relativní sladivost umělých sladidel	15
Tabulka 2: Akceptovatelný denní příjem jednotlivých umělých sladidel	17
Tabulka 3: Porovnání HPTLC a TLC desek	35

SEZNAM ZKRATEK

ACK	acesulfam K
ADI	akceptovatelný denní příjem
ADV	advantam
ALI	alitam
ASP	aspartam
CAD	aerosolový detektor nabitých částic
CYC	cyklamát
DAD	detektor s diodovým polem
DUL	dulcin
EFSA	evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
ESI	ionizace elektrosprejem
FAO	světová organizace pro výživu a zemědělství
GIT	trávicí trakt
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
JECFA	mezinárodní výbor pro potravinářské přídatné látky, který je spravován Organizací spojených národů pro výživu a zemědělství a Světovou zdravotnickou organizací
LD 50	dávka, která způsobí smrt 50 % testovaných živočichů
NEO	neotam
NHDC	neohesperidin dihydrochalkon
NOAEL	nejvyšší dávka bez nepříznivého účinku na organismus
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
PLOT	kapilární kolona s fází vázanou na pórovitém adsorbentu
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SAC	sacharin
SCOT	kapilární kolona s potaženou vrstvou nosiče
SFE	superkritická fluidní extrakce

SPE	extrakce pevnou fází
STV	steviosid
SUC	sukralóza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHT	vysokoteplotní úprava potravin
UV	ultrafialové záření
VIS	absorpce ve viditelné oblasti
WCOT	kapilární kolona s potaženými stěnami
WHO	světová zdravotnická organizace

1 ÚVOD

Lidé konzumují velké množství cukru, což vede k nárustu civilizačních chorob jako je například obezita a cukrovka, a právě to je jeden z důvodů, proč je běžný cukr často nahrazen umělými sladidly, která jsou v dnešní době používána v několika odvětvích.

První kapitola pojednává o obecné charakteristice, klasifikaci a regulaci sladidel. Druhá kapitola je zaměřena na konkrétní umělá sladidla a jejich fyziologické účinky. Bezpečnost sladidel je stále diskutovaným tématem, jelikož některá umělá sladidla naznačují možnou toxicitu. Riziko však nemusí představovat samotné sladidlo, ale látka, na kterou se v těle přemění.

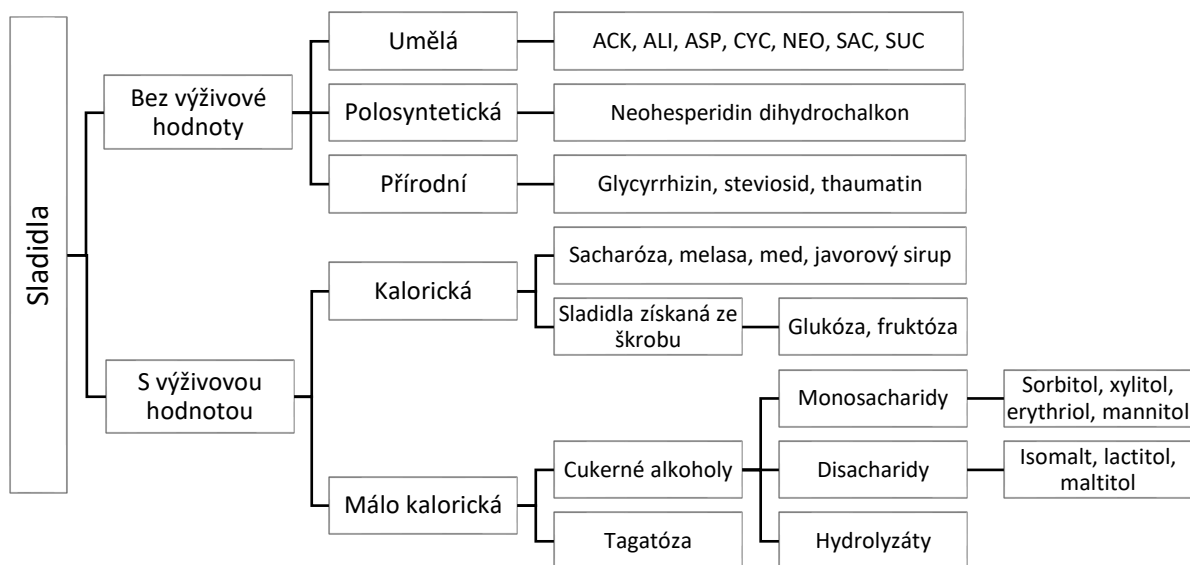
Třetí kapitola pojednává o stanovení umělých sladidel, která jsou rozmanitou skupinou látek, takže je lze stanovovat pomocí velkého množství technik. Tato práce je však zaměřena na chromatografické techniky, které jsou často používány pro stanovení nejen umělých sladidel.

2 Obecná charakteristika sladidel

Sladidla jsou definována jako potravinářské přídatné látky (tzv. aditiva). Jsou to obecně látky úmyslně přidávané do potravin a dalších produktů za účelem vylepšení jejich vlastností. Mezi potravinářské přídatné látky dále řadíme například vitamíny, konzervanty, antioxidanty, stabilizátory, emulgátory, zahušřovadla, želírující látky, barviva, kyseliny, regulátory kyselosti, látky zvýrazňující chuť nebo aroma, tavicí soli, kypřící látky, odpěňovače, protispěkové látky apod. Cílem sladidel je dodání sladké chuti a využívají se z několika funkčních důvodů. Svou sladkostí mohou maskovat hořkost, regulovat viskozitu, přidávat chuť, měnit bod mrazu, prodlužovat čerstvost a skladovatelnost. Některá sladidla se mohou přirozeně vyskytovat v ovoci, zelenině nebo houbách [1-4].

2.1 Klasifikace sladidel

Sladidla můžeme dělit podle několika kritérií (obrázek 1) a vždy záleží na úhlu pohledu. Obvykle sladidla dělíme podle energetické hodnoty, původu, sladivosti a chemické struktury.



Obrázek 1: Klasifikace sladidel [5]

2.2 Energetická hodnota

Nejčastěji se můžeme setkat s rozdělením sladidel podle kalorické hodnoty na výživová a nevýživová, tedy sladidla s kalorickou hodnotou nebo bez. Některá sladidla se řadí mezi nevýživová a zároveň jsou zdrojem energie např.: aspartam, neohesperidin dihydrochalcon a thaumatin. Při porovnání kalorických hodnot těchto sladidel s cukernými alkoholy,

monosacharidy a disacharidy se jedná o velmi malé hodnoty, a proto nejsou zařazeny mezi výživová sladidla. Rozdělení podle energetické hodnoty, které používají řídicí orgány (JECFA, EFSA apod.), je důležité pro jedince trpící cukrovkou nebo dalšími nemocemi vyžadující kontrolu nad kalorickým příjmem [6-8].

2.2.1 Původ

Podle původu dělíme sladidla hlavně na přírodní a syntetická (umělá). Některá sladidla (NHDC) patří mezi přírodní modifikovaná (polosyntetická), což jsou látky připravované z přírodních látek a dále cukerné alkoholy, které patří do skupiny syntetických látek identických s přírodními [6, 9].

2.2.2 Sladivost

Sladivost všech sladidel (tabulka 1) se posuzuje ve srovnání se sladivostí cukru – sacharózy. Sacharóza je považována za standardní sladkou látku a její hodnota sladivosti se rovná jedné. Sladivost může být ovlivněna koncentrací sladidla, teplotou v době spotřeby, pH a dalšími faktory [3, 8].

Tabulka 1: Relativní sladivost umělých sladidel

	Relativní sladivost (Sacharóza = 1)
Acesulfam K	200
Aspartam	160–220
Cyklamát	30–40
Sacharin	240–300
Sukralóza	400–800
Neohesperidin dihydrochalkon	250–2000
Neotam	7000–13000
Advantam	37000

2.2.3 Chemická struktura

Sladidla představují rozmanitou skupinu látek (terpeny, chalkony, peptidy, halogenové disacharidy atd.), které se od sebe liší fyzikálními i chemickými vlastnostmi, takže lze sladidla rozdělit i podle chemické struktury. Obvykle se ale řídíme spíše předchozími rozděleními [3, 10].

2.2.4 Bezpečnost a regulace sladidel

O bezpečnost a regulaci se stará několik mezinárodních organizací a před uvedením na trh musí být každé sladidlo pečlivě zkoumáno. Na základě výsledků studií a doporučení se jednotlivé státy rozhodují, jestli sladidlo na trh uvedou nebo ne. Proto se povolená sladidla v různých zemích liší nebo je použití omezeno pouze na některé výrobky.

Jednou z hlavních organizací je Světová organizace pro výživu a zemědělství (FAO) společně se Světovou zdravotnickou organizací (WHO). Obě společnosti patří pod Organizaci spojených národů a mají za úkol vyhodnocovat nezávadnost sladidel a poskytovat poradenství členským státům. V roce 1962 byla ustavena Komise pro kodex výživy při FAO/WHO, která měla za úkol uvést mezinárodní výživové standardy do praxe. Obě organizace společně dohlíží na ochranu zdraví spotřebitelů [3, 11].

Další organizací je Společný výbor expertů FAO/WHO pro potravinářská aditiva (JECFA) řízený FAO a WHO. Členové jsou odborníci z celého světa a mají za úkol především vědecké poradenství. Určují například akceptovatelný denní příjem a hodnotí toxikologická data. Výbor se schází dvakrát ročně a zabývá se potravinářskými aditivy, kontaminanty a přirozeně toxickými látkami v potravinách [3, 12].

Bezpečností sladidel se zabývají i další společnosti. V roce 2002 byl v Evropě založen Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a dále například Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) [3].

Povolená umělá sladidla v České republice jsou podle nařízení komise (EU) č.231/2012 [13] acesulfam K, aspartam, cyklamáty, sacharin a jeho soli, sukralóza, neohesperidin dihydrochalkon, neotam, sůl aspartamu-acesulfamu a přírodní thaumatococcus a steviol-glykosidy. V roce 2014 došlo k povolení advantamu na základě nařízení komise (EU) č. 497/2014. Ve všech těchto nařízeních jsou uvedena povolená aditiva pod číselnými kódy E, které usnadňují identifikaci těchto látek a uvádí se na potravinách. Číselný kód E se skládá z písmena E a tří případně čtyř čísel, kde první číslo značí kategorii látky. Umělá sladidla patří do kategorie E9xx, tedy náhradní sladidla, potravinářské plyny a leštidla [4, 14].

2.3 Akceptovatelný denní příjem

Akceptovatelný denní příjem je množství denní dávky, které může konzument přijímat každý den po celý život a není vystaven riziku. Tato hodnota je odvozená z hodnoty NOAEL, kde je použitý bezpečnostní faktor 100. To znamená, že hodnota ADI je 100x nižší než NOAEL

a je pro všechny bezpečná. Hodnota ADI se u jednotlivých umělých sladidel liší (tabulka 2) a vyjadřuje se v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti (mg/kg).

Tabulka 2: Akceptovatelný denní příjem jednotlivých umělých sladidel

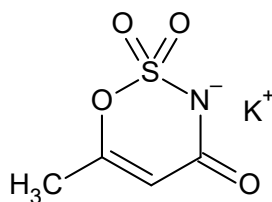
	ADI (mg/kg/den)
Acesulfam K	15
Aspartam	40
Cyklamát	11
Sacharin	5
Sukralóza	15
Neohesperidin dihydrochalkon	5
Neotam	2
Advantam	5

I když se některá sladidla zdají být nebezpečná, je důležité mít stále na paměti, že množství umělého sladidla v potravinách a nápojích jsou minimální kvůli své několikanásobně vyšší sladivosti oproti sacharóze. Všechna sladidla před uvedením na trh prochází důkladným testováním na zvířatech, při kterém se studuje toxikokinetika – absorpce, distribuce, metabolizace, exkrece [3, 10].

3 Umělá sladidla

3.1 Acesulfam K (E 950)

Acesulfam K (obrázek 2) byl objeven Claussem a Jensenem v roce 1967. Na acesulfam K narazili zcela náhodou, když Clause při práci v laboratoři zaujala sladká chuť prstu, který si omylem olízl. Acesulfam K je derivátem kyseliny acetyloctové a má slabě nahořklou chuť. Ve vodě je dobře rozpustný, v ethanolu je rozpustný málo, ale s naředěním vodou se rozpustnost postupně zvyšuje. Při velice nízkém pH, menším než 3, nebo vyšších teplotách než 235 °C je méně stabilní a může docházet k degradaci [3, 9, 13, 15-17].



Obrázek 2: Strukturální vzorec acesulfamu K

3.1.1 Fyziologické účinky

Acesulfam K není v lidském těle metabolizován a přibližně do 24 hodin se více než 99 % vyloučí močí v nezměněné podobě. Acesulfam K obsahuje methylenchlorid, který při dlouhodobé expozici může způsobovat bolest hlavy, nevolnost, depresi, a hlavně může mít účinek na ledviny a játra. Dalším rizikem může být acetoacetamid, který vzniká rozkladem acesulfamu K. Ten je sice toxický, ale pouhé 1 % acetoacetamidu se v těle hromadí po dobu tří měsíců. Malá koncentrace samotného acesulfamu K se může objevit ve tkáních plodu, ale placenta působí jako ochranná bariéra, takže podle studií acesulfam K pro plod nepředstavuje riziko. I když některé studie naznačovaly možnou toxicitu acesulfamu K, žádná z nich ji neprokázala a acesulfam K je tedy označen jako bezpečné sladidlo [3, 7, 10, 15, 16].

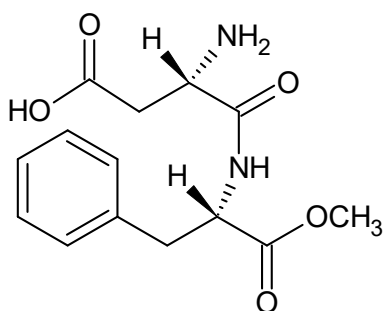
3.1.2 Využití

Acesulfam K patří mezi nejpoužívanější umělá sladidla a jednou z jeho výhod je, že se může používat v kombinaci s dalšími sladidly (ASP, CYC, SUC). Tím se dá získat lepší chuť než při samostatném použití. Například v sycených nápojích je nejpoužívanějším nízkokalorickým umělým sladidlem, a právě v nápojích se běžně používá v kombinaci. Díky své chuti je často obsažen ve šťávách s příchutí citrusů nebo kole. Často je obsažen v produktech bez cukru, které jsou vhodné i pro diabetiky. Další výhodou acesulfamu K je vynikající stabilita při vysokých teplotách, kterých dosahujeme například při výrobě cukrovinek nebo pekárenských výrobků.

Při pečení si zachová stejnou chuť, a navíc produkty při pečení neztmavnou. Také se často přidává do mléčných výrobků, které jsou ošetřeny pomocí UHT a produktů, které jsou konzervované. Ve farmaceutickém průmyslu je součástí produktů ústní hygieny, a také se přidává do pastilek, tablet, šumivých tablet pro zamaskování špatné chuti účinné látky. Acesulfam K, jako aniont, by mohl s úpravou chutí léčiv ovlivnit také rozpustnost a absorpci v těle [3, 6-8, 15, 17].

3.2 Aspartam (E951)

Aspartam (obrázek 3), byl objeven náhodou v roce 1965 při výzkumu nových léků pro terapii žaludečního vředu. Chemik James M. Schlatter ze společnosti G. D. Searle & Company v jednom mezikroku syntézy tetrapeptidu syntetizoval metylester aspartylfenylalaninu. Trocha této sladké látky mu zůstala na jeho prstech a on si je díky nepozornosti omylem olíznul. Prsty si olíznul několikrát, protože věřil, že se nejedná o toxickou látku. O pár let později se na vývoji aspartamu podílela norská chemická inženýrka Torunn Atteraas Garin, které pomohla vyvinout aspartam jako náhražku cukru a stala se mluvčí tohoto produktu. K povolení aspartamu ale docházelo postupně kvůli častým pochybnostem jeho bezpečnosti. V roce 1981 byl aspartam schválen FDA pro použití v nevodných produktech (žvýkačky, instantní kávy a nápoje) a o dva roky později pro použití v sycených nápojích, tedy ve vodných roztocích. Až v roce 1993 bylo schváleno i použití v pečených výrobcích a sladkostech. Dnes je možné legálně využívat aspartam ve všech potravinách. Aspartam nevykazuje žádné vedlejší pachuti. Ve vodě a ethanolu je málo rozpustný a v pevné formě je stabilní více než pět let [6, 9, 13, 17-20].



Obrázek 3: Strukturální vzorec aspartamu

3.2.1 Fyziologické účinky

Aspartam se v trávicím traktu rozkládá na kyselinu asparagovou (~40 %), fenylalanin (~50 %) a methanol (~10 %). Všechny tyto látky, kromě samotného aspartamu, se absorbují do krevního řečiště a při běžném podání, kdy se aspartam nevyhne trávicímu traktu, nepředstavují žádné

bezpečnostní riziko. Navíc tyto látky jsou součástí běžných potravin, ve kterých jsou obsaženy ve větším množství než při konzumaci aspartamu. Příkladem může být rajčatová šťáva, která obsahuje 6x více methanolu než kola dochucená aspartamem.

V lidském těle dochází pomocí trávicích enzymů k přeměně methanolu na formaldehyd a následně k oxidaci na kyselinu mravenčí. Formaldehyd je označován jako potenciální karcinogen, a proto je aspartam označován jako nebezpečný pro použití v potravě. Problém nastává, když je metabolismus kyseliny mravenčí přetížen, a tím dochází k hromadění v krvi. Při studiích bylo podáváno 200 mg/kg a při takto extrémních látkách byla zaznamenána pouze zvýšená koncentrace methanolu. Vzhledem k tomu, že hodnota ADI aspartamu je stanovena na 40 mg/kg, je velice nepravděpodobné až téměř nemožné, aby methanol z aspartamu při běžné konzumaci působil na tělo toxickým účinkem.

Aspartát je konjugovaná báze kyseliny asparagové a v této formě se vyskytuje v organismu, kde funguje jako neurotransmiter. Při vysokých koncentracích aspartátu v krvi je toxicita spojena s nekrózou neuronů. Opět se ukázalo, že je prakticky nemožné dosáhnout tak vysokých koncentrací při běžné konzumaci.

Také fenylalanin se může při vysokých koncentracích hromadit v těle, což může být problém u jedinců s narušeným metabolismem fenylalaninu, tedy u jedinců trpících fenylketonurií, u kterých hrozí neurologické problémy. Proto musí být potraviny obsahující aspartam podle nařízení EU viditelně označeny a musí zde být jasně napsáno, že je aspartam zdrojem fenylalaninu. Fenylalanin může být v játrech přeměněn i na tyrosin.

V prostředí s vyšším pH než 6 může dojít k přeměně aspartamu na karcinogenní látku diketopiperazin. Proto je potřeba dávat pozor, v jakých potravinách se aspartam využívá.

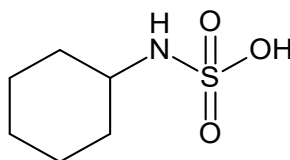
Při častém užívání aspartamu se mohou objevovat závratě, nevolnost, únava. Někteří odborníci dokonce tvrdí, že může způsobovat Alzheimerovu chorobu, epilepsii, roztroušenou sklerózu nebo vznik nádorů, nicméně žádná studie tato tvrzení nepotvrdila. I když aspartam nepůsobí příliš bezpečně, je povoleným sladidlem [7, 10, 21].

3.2.2 Využití

Aspartam se prodává například pod názvy Nutrasweet a Equal. Používá se jako stolní sladidlo a často je obsažen v sycených, nesyčených a šumivých nápojích. Vzhledem k tomu, že je krátkou dobu stabilní při vysoké teplotě, je vhodný pro použití v potravinách vyžadující při přípravě krátkodobé zahřátí. Aspartam se používá i ve farmaceutickém průmyslu [3, 7, 17].

3.3 Cyklamát (E952)

Sladkou chuť solí kyseliny cyklohexylsulfamové jako první objevil v roce 1937 student Univerzity Illinois Michael Sveda. V řadě zemích včetně zemí Evropské unie je cyklamát povolený, ale například v USA je od roku 1969 zakázané používat cyklamáty v potravinách. Cyklamáty jsou skupinovým názvem pro cyklohexylsulfamovou kyselinu (obrázek 4) a její soli, nejčastěji soli vápenaté a sodné. Cyklamová kyselina je ve vodě dobře rozpustná (1 g/7,5 ml) a je silnou kyselinou. I když je rozpustnost ve vodě dobrá, díky své kyselosti se více využívají soli. Vápenatá sůl se v potravinářství používá, ale může způsobit srážení a gelovatění. Tento problém nenastává při použití sodné soli, která je díky svým vlastnostem z těchto tří látek v potravinářství nejpoužívanější. Obě soli jsou silnými elektrolyty a ve vodě jsou lépe rozpustné (1 g/4-5 ml). V organických rozpouštědlech, olejích a nepolárních rozpouštědlech je však rozpustnost nízká [2, 3, 7, 13, 15-17].



Obrázek 4: Strukturální vzorec cyklamátu

3.3.1 Fyziologické účinky

K absorpci cyklamátu dochází v trávicím traktu, kde se přibližně 37 % absorbuje v tenkém střevě a zbytek postupuje až do tlustého střeva. Absorbované i neabsorbované množství se vyloučí v nezměněné podobě močí. Díky mikroflóře v tlustém střevě může u některých jedinců docházet k metabolické přeměně cyklamátu na cyklohexylamin. Tuto schopnost má podle studií přibližně 25 % populace. Metabolismus je tedy u části populace odlišný, a navíc se může i průběžně měnit. Závisí také na dávce a způsobu podání. Při dlouhodobém užívání cyklamátu je větší pravděpodobnost, že dojde k metabolismu na cyklohexylamin než u jednorázových dávek. Některé studie dokázaly, že dlouhodobé užívání cyklamátu může způsobovat nádor močového měchýře. Samotný cyklamát nebezpečný není, ale právě vznikající metabolit cyklohexylamin je toxický. I přes to, že k přeměně na cyklohexylamin dochází jen u části populace, je cyklamát v některých zemích zakázaný [3, 7, 17, 22].

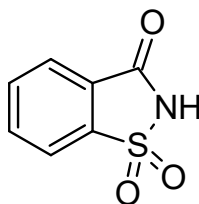
3.3.2 Využití

Cyklamát se používá hlavně v nápojích a jako stolní sladidlo. Dále se používá v nízkokalorických potravinách, dezertech, želatinách a konzervovaném ovoci. Cyklamát má lehce nahořklou chuť, takže se často používá v kombinaci se sacharinem jako binární směs nebo

v kombinaci s aspartamem a acesulfamem K, s kterými tvoří ternární směs. Tyto směsi jsou považovány za velice dobré kombinace sladidel [7, 17].

3.4 Sacharin (E954)

Sacharin objevil v roce 1878 Ira Remsen a Constantine Fahlberg při studiích cyklických sulfonamidů a stalo se tak vůbec prvním komerčně používaným umělým sladidlem. Sacharin, sulfonamidový derivát toluenu (obrázek 5), byl nejdříve používán jako lék proti cukrovce, ale během světových válek se jeho používání natolik rozšířilo, že se začalo používat jako běžné sladidlo. Sacharin má slabě aromatickou vůni a může být ve formě kyseliny nebo vápenaté a draselné soli. Všechny jeho formy jsou velice stabilní v širokém rozmezí teplot a pH. Sacharin ve formě kyseliny je oproti solím ve vodě málo rozpustný. Při teplotě 20 °C se rozpustí 2 g/l a při 75 °C 13 g/l, takže s narůstající teplotou se rozpustnost mírně zvyšuje. Sodné soli sacharinu se ve vodě při teplotě 20 °C rozpustí 1000 g/l a při 75 °C se rozpustí 2540 g/l. Vápenaté soli sacharinu se ve vodě při teplotě 20 °C rozpustí 370 g/l a při 75 °C 2020 g/l [3, 6, 7, 10, 13, 17, 23, 24].



Obrázek 5: Strukturální vzorec sacharinu

3.4.1 Fyziologické účinky

Přibližně 85-90 % sacharinu se v lidském těle absorbuje, váže na plazmatické proteiny a následně distribuuje do orgánů. K vyloučení dochází převážně močí a v malém množství stolicí. V lidském těle tedy nedochází k metabolizaci. Sacharin se může dostat přes placentu, ale žádné nežádoucí účinky u matek nebo plodu nebyly prokázány. I přes to je doporučeno nekonzumovat sacharin během těhotenství a kojení, protože u kojících žen může dojít k přenosu mateřským mlékem. Sacharin se stal často tématem diskuze ve spojení s možnou karcinogenitou, protože při testech na potkaních se často objevoval nádor močového měchýře. Ke zvýšenému výskytu rakoviny močového měchýře u potkanů docházelo hlavně při konzumaci vyšších koncentrací sacharinu sodného, méně u sacharinu draselného a u kyselé formy vůbec. Kvůli obavám z možného vzniku rakoviny FDA v roce 1997 doporučila zákaz sacharinu. Při vysokých dávkách docházelo k alkalizaci moči potkanů a následně se v močovém měchýři tvořily sraženiny obsahující cytotoxický fosforečnan vápenatý, silikáty,

mukopolysacharidy a proteiny. Tyto sraženiny mohou poškozovat tkáň, což může vést až ke vzniku nádoru. Při testech na lidech a primátech se tento problém nevyskytoval, objevoval se pouze u potkanů, a proto v roce 2000 byl sacharin vyřazen ze seznamu karcinogenních látek a opět označen za bezpečné sladidlo pro použití v potravinách. K povolení v některých zemích včetně USA došlo až v posledním desetiletí [3, 6, 7, 10, 24, 25].

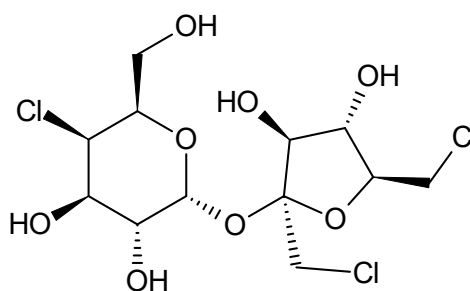
3.4.2 Využití

Sacharin se prodává pod názvy Sweet Twin, Sweet and Low a stále patří mezi nejlevnější a nejpoužívanější sladidla. V dnešní době se používá hlavně v potravinách určených pro lidi snažící se udržet si svou hmotnost. Mezi nejčastější produkty obsahující sacharin patří nealkoholické nápoje, stolní sladidla a dezerty. Díky své stabilitě je vhodný pro použití v produktech s dlouhodobou trvanlivostí. Mezi další produkty z potravinářství patří želatina, omáčky, žvýkačky, marmelády a mnoho dalších. Také je obsažen v produktech ústní hygieny a přidává se do zemědělských meziproductů nebo krmiv pro zvířata. Sacharin se ale využíval i v dalších odvětvích jako je například farmaceutický průmysl, kde byl dříve používán jako antiseptikum. Dále se používal jako antistatický prostředek v plastikářském průmyslu. V současné době se používá při povrchových úpravách nikelnatých částí pomocí elektroformování, kterého lze využít v automobilovém průmyslu k vylepšení vzhledu částí nárazníků z niklu [3, 6, 7, 24].

3.5 Sukralóza (E955)

V 70. letech 20. století probíhalo několik výzkumů s cílem objevit nová umělá sladidla pro komerční účely. V roce 1976 ve společnosti Tate & Lyle objevili prof. Leslie Hough a jeho kolegové několik nových sladidel podobných sacharóze. Některé byly až 7500x sladší než sacharóza, ale se stoupající intenzitou zároveň klesala kvalita sladké chuti. Nakonec byla vybrána sukralóza, která měla nejvíce podobnou sladkou chuť sacharóze bez hořké chuti nebo pachuti, dobrou tepelnou a chemickou stabilitu, vysokou rozpustnost ve vodě a nízkou toxicitu. Sukralóza se vyrábí ze sacharózy, se kterou má podobnou chemickou strukturu (obrázek 6). Tři hydroxylové skupiny jsou v molekule sukralózy selektivně nahrazeny chlorem. Teplota tání je 125 °C a je snadno rozpustná ve vodě, methanolu a ethanolu. Při teplotě 20 °C se ve vodě

rozpustí 28,2 g/l, v ethanolu 110 g/l a s rostoucí teplotou rozpustnost roste. Při této teplotě je v kapalném stavu stabilní po dobu 5 let [3, 6, 10, 13, 17, 23, 24].



Obrázek 6: Strukturální vzorec sukralózy

3.5.1 Fyziologické účinky

Sukralóza je relativně nereaktivní molekula, která obsahuje glykosidickou vazbu. Ta se v molekule sukralózy neštěpí, a proto ji savci netráví a nedochází k metabolizaci. Důvodem je přítomnost chloru místo hydroxylových skupin a žádné testy neprokázaly, že by docházelo k dechloraci molekuly. Sukralóza se v lidském těle velice špatně absorbuje a přibližně 85 % neabsorbované sukralózy se rovnou vyloučí stolicí v nezměněné formě. Zbývajících 15 % je absorbováno pasivním transportem v trávicím traktu, kde dochází k distribuci do tkání, odkud se dostane do krevního oběhu a následně se vyloučí močí. Část absorbované sukralózy (1-5 %) podléhá biotransformaci, při které vznikají glukuronidové konjugáty. Vzhledem ke špatné absorpci jsou na místě obavy z případných nežádoucích účinků, ale bylo provedeno mnoho studií karcinogenity, genotoxicity a teratogenity, při kterých se žádné neobjevily. Dospělo se tedy k závěru, že sukralóza je vhodným umělým sladidlem pro použití v potravinách [3, 7, 10].

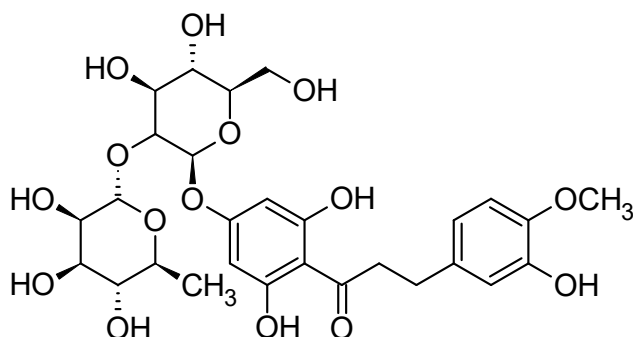
3.5.2 Využití

Sukralóza je univerzální umělé sladidlo, které se využívá v jakémkoliv potravinářském odvětví. Prodává se pod názvem Splenda. Odolává vysokým teplotám, takže je vhodná i pro použití v produktech vyžadující přípravu při vysokých teplotách např.: pasterizace, sterilizace nebo UHT [6, 17].

3.6 Neohesperidin dihydrochalkon (E959)

Neohesperidin dihydrochalkon objeven byl v roce 1963, kdy Horowitz a Gentili studovali spojitost hořké chuti se strukturou fenolických glykosidů v citrusových plodech. Objevili několik dihydrochalkonových neohesperidosidů, ale jen neohesperidin dihydrochalkon měl intenzivně sladkou chuť a vypadal jako slibné sladidlo. Neohesperidin dihydrochalkon (obrázek 7), je glykosidický flavanoid, který se připravuje z neohesperidinu nebo naringinu.

Pro komerční výrobu se neohesperidin získává extrakcí z kůry pomeranče *Citrus aurantium* a následnou syntézou zahrnující alkalicky katalyzovanou hydrogenaci. Naringin se získává extrakcí z kůry grapefruitu *Citrus paradisi* a následná syntéza je založena na přeměně na floroacetofenon-4'- β -neohesperidosid, který se kondenzuje isovalinem a vzniká neohesperidin. Neohesperidin lze získat případně i mikrobiologickou přeměnou flavanonových glykosidů. Od ostatních sladidel se liší chutí po mentolu a lékořici, která se může objevit při vyšších koncentracích. Intenzitu sladivosti můžeme výrazně zvýšit například při použití v kombinaci s kofeinem. Neohesperidin dihydrochalkon je snadno rozpustný v horké vodě, při 80 °C se rozpustí 650 g/l. S klesající teplotou rozpustnost klesá a při teplotě 20 °C se rozpustí pouze 0,50 g/l. Dále je rozpustný ve směsi ethanolu (96 %) s vodou, ale v samotném ethanolu rozpustnost výrazně klesá a v etheru nebo benzenu je prakticky nerozpustný. Rozpustnost se dá případně zvýšit přidáním glycerolu nebo jednosytných solí. Při pH 2-6 se neohesperidin dihydrochalkon vyznačuje vysokou stabilitou. Studie ukázaly, že neohesperidin dihydrochalkon je možné skladovat v nezměněném stavu při pokojové teplotě po dobu tří let. Protože se jedná o hygroskopickou látku, za vysoké teploty a nízkého pH může dojít k hydrolyze glykosidické vazby za vzniku aglykonu hesperidin dihydrochalkonu, glukózy a ramnózy [3, 6, 13, 23].



Obrázek 7: Strukturální vzorec neohesperidin dihydrochalkonu

3.6.1 Fyziologické účinky

K absorpci malého množství neohesperidin dihydrochalkon dochází v tenkém střevě, odkud se částečně vylučuje žlučí a částečně metabolizuje. K jeho absorpci dochází až po odstranění jeho sacharidové části. V průběhu se netvoří žádné metabolity, takže studie prokázaly bezpečnost neohesperidinu dihydrochalkonu [6, 17].

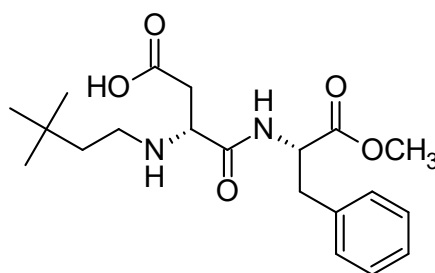
3.6.2 Využití

Neohesperidin dihydrochalkon se používá k dochucení žvýkaček, kde je důležité, aby se sladká chuť uvolňovala postupně, a proto je ve žvýkačkách obsažen ve větších koncentracích. Dále se

používá v potravinách s ovocnou chutí, převážně s chutí pomeranče a grapefruitu. Přidává se také do mléčných produktů, ovocných šťáv, džemů, sirupů, zmrzliny a je vhodný i pro použití v potravinách vyžadující pasterizaci. V některých produktech se nepoužívá jako sladidlo, ale jako látka k zahušťování a často se používá v kombinaci s dalšími sladidly a látkami [6, 7, 17].

3.7 Neotam (E961)

K objevení neotamu došlo v polovině 80. let, kdy probíhaly výzkumy, které měly za úkol objevit nová sladidla. Cílem bylo najít sladidlo podobné aspartamu, se snahou zanechat dobré vlastnosti aspartamu a špatné vlastnosti odbourat. Žádoucí tedy byla vyšší tepelná stabilita a vyšší sladivost. To se podařilo prof. Jean Marie Tinti a Claude Notre a až v roce 1991 byly zveřejněny výsledky výzkumů, díky kterým byl objeven právě neotam. Jedná se o poměrně nové umělé sladidlo a je považováno za nástupce aspartamu. Ke schválení neotamu pro všeobecné použití došlo v roce 2002 a v České republice je povolen od roku 2007. Neotam (obrázek 8) je derivátem aspartamu, ze kterého většinou vychází i příprava. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 80,9 – 83,4 °C, je dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu. Rozpustnost ve vodě se zvyšuje s rostoucí teplotou (při teplotě 25 °C rozpustí 12,6 g/l a při teplotě 60 °C 47,5 g/l). Neotam je relativně stabilní při pH 3,5 – 5,5 jako aspartam, přičemž ideální pH je 4,5. Ve vodných roztocích se stabilita výrazně mění při změnách pH a teploty. Výhodou neotamu oproti aspartamu je krátkodobá stabilita při vysokých teplotách, která je dostačující pro přípravu potravin například v pekařství. Za 30 minut dochází ke ztrátě 1,4 %, což je zanedbatelné množství. V pevném suchém stavu je při teplotě 15 – 30 °C stabilní minimálně po dobu pěti let [3, 6, 8, 17, 24, 26-28].



Obrázek 8: Strukturální vzorec neotamu

3.7.1 Fyziologické účinky

Neotam je v těle rychle, ale neúplně hydrolyzován pomocí esterázy za vzniku deesterifikovaného neotamu. Neotam i deesterifikovaný neotam se v těle nehromadí ani při opakovaném dávkování. Neotam se neabsorbuje a vylučuje stolicí přibližně za 72 hodin.

Deesterifikovaný neotam se po absorpci vylučuje močí. Jako u aspartamu se v průběhu metabolizace při tvorbě deesterifikovaného neotamu tvoří methanol, kterého je v případě neotamu pouze zanedbatelné množství.

Neotam je oproti aspartamu pro jedince trpící fenylketonurií bezpečný. Důvodem je rozdíl v chemické struktuře, kde v molekule neotamu je navíc *t*-butyl skupina, která se naváže na volnou aminoskupinu kyseliny asparagové. Tím dojde k přerušení peptidové vazby mezi kyselinou asparagovou a fenylalaninem, čímž se sníží dostupnost fenylalaninu, který je zodpovědný za fenylketonurii.

Bylo provedeno několik studií na zvířatech, při kterých se neobjevily žádné nežádoucí toxické účinky, pouze při podání vysokých dávek se objevovala nechut', takže potravu začala odmítat. Na základě výsledků testů, včetně Amesova testu, nebyl neotam ani deesterifikovaný neotam označen za mutagenní látku. Nebyly prokázány ani žádné nežádoucí účinky na reprodukci, těhotenství ani vývoj embrya i při vyšších dávkách. Nejnovější studie však ukazují, že neotam může na člověka při vysokých dávkách působit hepatotoxicky. Nutno podotknout, že zvířata po dobu testování byla vystavena deseti tisíckrát větší dávce, než je předpokládána u člověka. Při klinických studiích byl neotam podáván při různém dávkování po různou dobu a u žádného jedince nedošlo k významným změnám vitálních funkcí. Někteří jedinci dostávali placebo a v porovnání s dávkou neotamu nebyl žádný rozdíl. Do studií byli vybráni i jedinci s diabetes mellitus a ani u nich se nevyskytl žádný nežádoucí účinek na koncentraci glukózy nebo inzulinu. Všechny studie tedy jasně potvrzují bezpečnost neotamu [3, 6, 7, 17, 23, 24].

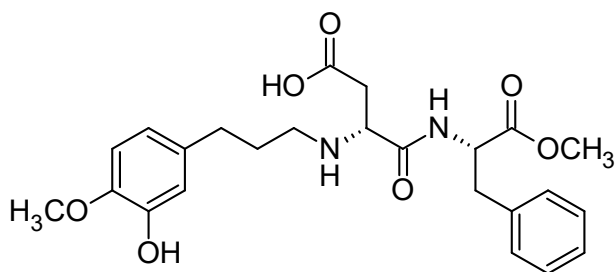
3.7.2 Využití

Neotam je společně s aspartamem a sukralózou nejvíce používaným umělým sladidlem v potravinářském a nápojovém průmyslu. Používá se v kombinaci s dalšími sladidly například se sacharinem a sukralózou. Prodává se pod názvem Newtame a používá se hlavně ke slazení nealkoholických nápojů, dále v mléčných nápojích, omáčkách, žvýkačkách a pikantních potravinách [7, 8, 17].

3.8 Advantam (E969)

Advantam byl vyvinut ve firmě Ajinomoto Co. Inc. a je výsledkem dlouhodobých výzkumů, které se zabývaly objevem nových umělých sladidel. S hledáním vhodné struktury pomáhal počítač na základě dostupných informací a požadavků na nové sladidlo. Struktura advantamu (obr. 9) byla poprvé zveřejněna v roce 2008 a k povolení pro použití v potravinách v zemích Evropské unie došlo v roce 2014. V České republice je nejnovějším povoleným a zároveň

nejsladším umělým sladidlem. Advantam (obrázek 9) má chemickou strukturu podobnou neotamu a syntéza vychází z aspartamu a vanilinu. Bod tání je stanoven na 101,5 °C a ve vodě a ethanolu je málo rozpustný. Při teplotě 25 °C se ve vodě rozpustí 0,099 g/100 ml a s narůstající teplotou se rozpustnost mírně zvyšuje [3, 7, 14, 29].



Obrázek 9: Strukturální vzorec advantamu

3.8.1 Fyziologické účinky

Advantam se absorbuje rychle, ale pouze v omezeném množství (4-23 %). Zbývající množství se v trávicím traktu hydrolyzuje na kyselinu, která se stejně jako advantam vylučuje převážně stolicí (87-93 %) a zbytek močí. Na prokázání nezávadnosti advantamu a jeho metabolitů bylo provedeno několik testů, ale žádné výsledky testů neprokázaly ani nenaznačily případnou mutagenitu, genotoxicitu nebo karcinogenitu. Při teratogenních studiích se sledovala reprodukce potkanů, kdy došlo k mírnému snížení tělesné hmotnosti u přírůstků, ale to nebylo považováno za podstatný vedlejší účinek. Advantam, stejně jako aspartam, je zdrojem fenylyalaninu, ale jedinci trpící fenylylketonurií mohou při normálních dávkách advantam konzumovat. Při studiích se neprokázal ani žádný vliv na hladinu glukózy a inzulínu. Neexistují tedy žádné pochybnosti o bezpečnosti advantamu [3, 7, 29, 30].

3.8.2 Využití

Advantam je díky své intenzivní sladké chuti vhodnou náhradou jak za cukr, s kterým má identickou chuť, tak i některá umělá sladidla. Osvědčil se jako sladidlo do kávy, ledového čaje, limonád, instantních nápojů, žvýkaček a jogurtů. Často se používá v produktech s ovocnou příchutí, hlavně citrusových plodů. Je vhodný i do nápojů, které vyžadují při přípravě vysokou teplotu [3, 7, 29].

4 Chromatografické metody pro analýzu umělých sladidel

Analýza umělých sladidel je důležitá především pro kontrolu bezpečnosti potravin, nápojů a dalších produktů. Povolená umělá sladidla se v jednotlivých zemích liší, a proto je důležité dohlížet na jejich obsah. Pro analýzu umělých sladidel existuje mnoho analytických metod. Výběr vhodné analytické metody závisí na mnoha kritériích: cena, způsob detekce, spotřeba vzorků a rozpouštědel, přesnost, selektivita, bezpečnost a jednoduchost. Ve většině případů se upřednostňují chromatografické metody, které umožňují analýzu několika sladidel současně a splňují nejvíce parametrů z uvedených požadavků [3, 26, 31].

Chromatografie je separační technika, při které dochází k separaci složek směsi na základě distribuce mezi dvě fáze – pohyblivá a nepohyblivá. Vzorek je unášen tokem mobilní fáze přes stacionární fázi, kde dochází k separaci vzorku na základě rozdílných afinit k mobilní a stacionární fázi.

Chromatografické metody se dělí podle skupenství mobilní fáze na kapalinovou a plynovou chromatografii. Speciálním případem je superkritická fluidní chromatografie, kde se jako mobilní fáze využívá plyn v nadkritickém stavu, tzn. nadkritická tekutina. Z hlediska uspořádání stacionární fáze se nejčastěji setkáváme s chromatografií kolonovou, kdy je stacionární fáze umístěna v koloně [32-35].

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je velice oblíbenou separační technikou díky svému univerzálnímu využití. HPLC může být použita pro analýzu téměř jakéhokoli vzorku. Předností HPLC je hlavně rychlost a možnost analýzy i složitých směsí obsahujících látky s podobnými vlastnostmi. Klasická kapalinová chromatografie, HPLC a UHPLC se od sebe liší především rozměry částic stacionární fáze. I když UHPLC má nejvyšší účinnost a nejkratší čas analýzy, nejrozšířenější technikou kapalinové chromatografie je stále HPLC [34-37].

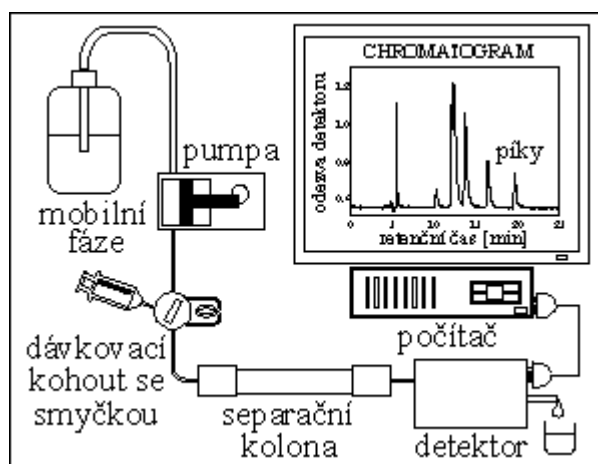
4.1.1 Instrumentace

Součástí HPLC (obrázek 10) jsou nádoby na mobilní fázi, které jsou obvykle vyrobeny ze skla a o objemu 0,5 l až 2,5 l. Jsou umístěné v uzavřeném prostoru a chrání tím osobu obsluhující přístroj před případnými toxickými parami rozpouštědel.

Mobilní fáze protéká kolonou pod vysokým tlakem pomocí membránového nebo pístového čerpadla. Použité čerpadlo musí odolávat vysokým tlakům (40-60 MPa, u UHPLC až tlaků

150 MPa), a proto musí být vyrobené z materiálů, které jsou za uvedených tlaků chemicky a mechanicky odolné. Nejčastěji používaným materiálem je nerezová ocel nebo keramika.

Ve směšovacím zařízení dochází k míchání mobilní fáze. V kapalinové chromatografii rozlišujeme izokratickou nebo gradientovou eluci. Při izokratické eluci je separace prováděna pouze jedním rozpouštědlem, případně směsí rozpouštědel o konstantním složení a složení mobilní fáze se tedy nemění. Při gradientové eluci se složení mobilní fáze v průběhu separace mění dle použitého programu. Slouží pro separaci složité směsi látek, které se významně liší retencí. K míchání dochází buď za nízkého nebo vysokého tlaku (nízkotlaký nebo vysokotlaký gradientový systém). U vysokotlakého systému je nutné využít pro každou složku mobilní fáze vlastní čerpadlo, čímž se systém prodražuje [34-37].



Obrázek 10: Schéma vysokoúčinného chromatografu [38]

Dávkování se provádí pomocí šesticestného dávkovacího ventilu nebo pomocí autosampleru, který umožňuje plynule dávkovat různé objemy vzorků. Je důležité vzorek dávkovat správně, neboť nesprávné dávkování by mohlo vést k nepřesným celkovým výsledkům [33-36].

Důležitou částí je kolona, kde probíhá samotná separace. Většina kolon je vyrobena z nerezové oceli, protože nesmí reagovat s jakoukoliv látkou procházející kolonou a musí být odolná vůči vysokým tlakům. Délka kolon se obvykle pohybuje v rozmezí 3-30 cm, přičemž s rostoucí délkou se zvyšuje účinnost. Kolony jsou naplněny porézními částicemi (2-5 μm) a na koncích jsou porézní frity, které mají menší průměr, než je velikost samotných částic. Jako náplň se obvykle používají kolony na bázi silikagelu díky svým chemickým a fyzikálním vlastnostem. Příkladem běžně používané náplně u chromatografie s obrácenými fázemi je silikagel s chemicky vázanou oktadecylovou (C18) skupinou [33-35, 39].

Dále je důležité vybrat vhodný detektor, který by měl mít vysokou citlivost, selektivitu, široký lineární dynamický rozsah, mít rychlou odezvu a nemít destruktivní vliv na analyzovanou látku.

Mezi nejoblíbenější detektory patří spektrofotometrické, které měří absorpenci eluátu protékající detekční celou. Jednodušší detektory měří absorpenci při jedné vlnové délce, složitější umožňují pomocí monochromátoru nastavit vlnovou délku vhodnou pro detekci daného vzorku. Nejdokonalejší DAD detektory jsou schopné pomocí diodového pole zaznamenat spektra bez přerušení separace. Zdrojem záření je například rtuťová nebo zinková výbojka a v případě DAD je zdrojem deuteriová výbojka. Nevýhodou fotometrických detektorů je omezení, že detekovaná látka musí absorbovat ultrafialové záření.

Elektrochemické detektory jsou založeny na měření proudu, potenciálu elektrod nebo elektrické vodivosti látek, u kterých při průchodu měrnou celou dochází na elektrodě k elektrochemické reakci (redoxní). Proto se elektrochemické detektory často používají při detekci anorganických kyselin, zásad a solí. Výhodou těchto detektorů je selektivita, citlivost a cena. Nevýhodou je vyžadující čistota mobilní fáze, a také může docházet k zanášení povrchu elektrod.

Vysokou selektivitu a citlivost poskytují fluorescenční detektory, které jsou založeny na měření fluorescence. Detekovaná látka absorbuje primární ultrafialové záření, které je částečně vyzářeno ve formě sekundárního fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce a následně snímáno.

Mezi univerzální detektory se řadí refraktometrické, které lze použít při detekci v podstatě všech látek, ale využívají se spíše jen tehdy, když z nějakého důvodu nelze použít jiný detektor. Při detekci se měří rozdíl indexu lomu eluátu a mobilní fáze. Nevýhodou je menší citlivost, která závisí na rozdílu indexů lomu (čím větší rozdíl, tím větší citlivost) a na konstantní teplotě [34, 36, 37, 40].

V dnešní době se k detekci často používá hmotnostní spektrometr, který se v posledních letech stal mocným analytickým nástrojem pro rutinní analýzu. Je tomu také z důvodů požadavků na vhodný detektor pro HPLC, kterému je hmotnostní spektrometr nejbližší. Při hmotnostní spektrometrii se vzorek převádí na ionizovanou plynnou fázi a dle podílu hmotnosti a náboje se ionty separují [35, 37, 39, 41].

4.1.2 Systémy v HPLC

V kapalinové chromatografii se využívá několik fázových systémů, dle kterých se dělí. Nejčastěji se můžeme setkat s rozdělením na systém s normálními fázemi a obrácenými fázemi.

4.1.2.1 HPLC v systému s normálními fázemi

V systémech s normálními fázemi je stacionární fází polární látka (silikagel, silikagel s navázanou aminoskupinou, atd.). Mobilní fází je nepolární rozpouštědlo (hexan, ethylacetát nebo binární či terciární systém rozpouštědel). Při průchodu kolonou v průběhu eluce tedy jako první eluuje nejméně polární látka vzorku a při zvýšení polaroty mobilní fáze se eluční čas zkracuje. Nicméně v současnosti převládá hlavně systém s obrácenými fázemi.

4.1.2.2 HPLC v systému s obrácenými fázemi

V systémech s obrácenými fázemi je polarita fází obrácená. Stacionární fází je nepolární látka, nejčastěji oktadecylsilikagel (C18). Jako mobilní fáze se používají polární rozpouštědla, která jsou dobře mísitelná s vodou. Příkladem může být acetonitril, methanol či tetrahydrofuran. Při eluci se tedy naopak nejdříve eluuje nejpolarnější látka vzorku, takže eluční čas se prodlužuje s rostoucí polaritou mobilní fáze [32-36].

Speciálním případem je chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), která je kombinací kapalinové chromatografie s normálními a obrácenými fázemi. Používá se při separaci polárních a hydrofilních látek. V HILIC převažuje rozdělovací mechanismus mezi mobilní fází chudou na vodu a stacionární fází bohatou na vodu. Při separaci se používají stejné kolony jako u NP-HPLC, protože silně hydrofilní látky jsou v RP-HPLC nedostatečně zadržovány. V nevodných mobilních fázích NP-HPLC jsou hydrofilní látky naopak zadržovány příliš, takže jako mobilní fáze se používá organické rozpouštědlo s vodou, které je naopak typické pro RP-HPLC. Mobilní fáze musí obsahovat nejméně 60 % organického rozpouštědla, zároveň nejméně 2 % vody a případně pufr. Obvyklým organickým rozpouštědlem je acetonitril, který je dobře mísitelný s vodou, umožňuje dobrou retenci a má nízkou viskozitu [39, 42-47].

4.1.3 Vybraná HPLC stanovení

Dříve byly navrženy postupy pouze pro analýzu jednotlivých umělých sladidel. V dnešní době se ale obvykle umělá sladidla používají v kombinaci s dalšími sladidly a látkami, a proto jsou vyžadovány postupy umožňující analyzovat několik umělých sladidel současně [48].

Univerzální a zároveň nejstarší metodou pro analýzu umělých sladidel je RP-HPLC ve spojení se spektrofotometrickým detektorem, v dnešní době obvykle detektor s diodovým polem (DAD). Jeden z postupů HPLC-DAD navrhli Burcu Sezgin a kol. [49] pro stanovení 7 umělých sladidel (ACK, ASP, ALI, SAC, NEO a NHDC) v různých potravinách a farmaceutických výrobcích. Při navrhování postupu je důležitým krokem správný výběr stacionární a mobilní fáze. V tomto postupu bylo tedy porovnáváno několik stacionárních fází, nicméně některé

například nebyly schopné oddělit NEO a NHDC, a proto se nejvíce osvědčila obvykle používaná kolona C18. Při výběru mobilní fáze byla porovnávána směs methanol – voda a acetonitril – voda, přičemž se osvědčila hlavně směs acetonitril – voda z důvodů vyšší účinnosti separace. Pro detekci byl použit detektor DAD, který lze použít k detekci většiny umělých sladidel.

Detekce pomocí spektrofotometrických detektorů je v řadě postupů preferována, ale ne vždy je vhodnou volbou. Jak již bylo zmíněno, cyklamát nebo sukralóza neobsahují chromofor, který je pro spektrofotometrickou detekci potřebný. Proto je pro látky neobsahující chromofor vhodnější použít odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD) nebo hmotnostní spektrometr [6, 15-17, 50].

Andrzej Wasik a kol. [51] navrhli postup HPLC ve spojení s detekcí pomocí ELSD pro analýzu několika umělých sladidel (ACK, ASP, CYC, SUC, SAC, NHDC a TAU), tedy včetně cyklamátu a sukralózy. Pro analýzu umělých sladidel se často používají mobilní fáze s fosfátovými pufrů, které ale nejsou s ELSD kompatibilní. V postupu Pavla Diviše a kol. [52] se zaměřili právě na výběr vhodné mobilní fáze, při které dojde k oddělení všech analytů, čehož se docílilo při použití směsi methanolu, kyseliny mravenčí, triethylaminu a acetonu. V obou těchto postupech bylo použito stejné složení mobilní fáze pouze v jiném poměru složek. V kombinaci s touto mobilní fází bylo nejvhodnější použít nepolární kolonu C18. Rozdílem těchto dvou postupů byl způsob detekce, který je v obou postupech shodný pomocí ELSD, ale v postupu Pavla Diviše a kol. [52] byl navíc současně s ELSD použitý i detektor DAD, což umožnilo získat ještě přesnější výsledky.

V posledních letech se stala často používaným nástrojem pro stanovení umělých sladidel metoda HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která se zdá být nejlepší dostupnou metodou. Výhodou je citlivost, přesnost, selektivita i u vzorků s nízkou koncentrací a lze stanovit i látky, které neabsorbují záření v UV a viditelné oblasti. K ionizaci se nejčastěji využívá elektrosprej (ESI), kdy eluát po opuštění kolony prochází kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Aerosol vznikající na konci kapiláry nese náboj a postupným odpařováním kapiček rozpouštědla dochází k uvolnění nabitého analytu, který je fokusován do hmotnostního analyzátoru. Výhodou ESI je šetrnost vůči analyzovaným látkám, protože dochází k menší tepelné degradaci. Další výhodou je zvýšená citlivost a možnost analýzy i vysokomolekulárních látek. Příkladem současného stanovení několika umělých sladidel (ASP, SAC, SUC, ACK, NEO, CYC, ALI a STV) pomocí metody HPLC-ESI/MS je postup,

který navrhli Yang a Chen [48]. Separace byla provedena na koloně C18 při gradientové eluci. Při použití acetonitrilu neprobíhala separace tak dobře, jako v případě směsi methanol – pufr, takže se v tomto postupu osvědčila mobilní fáze ve složení methanol, kyselina mravenčí, trimethylamin a voda. K detekci se použil hmotnostní spektrometr vybavený ESI v negativním iontovém režimu. Odezva ESI je závislá na těkavosti a povrchovém napětí rozpouštědla, a proto byl do směsi mobilní fáze navíc přidán aceton, čímž se zvýšila účinnost ionizace, a tedy i rychlost odezvy ESI [31, 39, 41, 48, 53].

Při použití samostatného kvadrupólového hmotnostního analyzátoru je nevýhodou vysoká intenzita šumu znečišťujících látek ve vzorku, a proto se osvědčila spíše tandemová hmotnostní spektrometrie, kde je šum nižší. Další výhodou HPLC-MS/MS je lepší citlivost, selektivita a rychlost. Omezením je však vyšší cena, a proto je v řadě postupů stále často používán HPLC-MS [35, 54].

V posledním desetiletí narůstá počet analýz pomocí HILIC, která se stala cenným nástrojem i pro analýzu umělých sladidel. Paweł Kubica a kol. [55] ve svém postupu porovnávali metody HILIC-MS/MS s RP-HPLC-MS/MS pro analýzu osmi umělých sladidel a steviol glykosidů v nápojích. Pro detekci byla u obou metod použita tandemová hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem. Pro většinu umělých sladidel bylo využito snímání záporných iontů, nicméně pro ASP, ALI a NEO byla pozorována lepší ionizace při snímání kladných iontů. Separace byla provedena na stejném přístroji UHPLC, rozdíl byl hlavně v použitých kolonách. Pro RP-HPLC byla použita nepolární kolona C18, jako mobilní fáze A methanol – aceton – voda a mobilní fáze B acetonitril – aceton. U metody HILIC bylo důležité nejdříve vybrat správnou kolonu, přičemž nejvhodnější byla silikagelová kolona Acclaim Trinity P2, která se skládá z vysoce porézních částic silikagelu potažených nabitými částicemi nanopolymeru. Výhodou této kolony byla dostatečná separace všech analyzovaných umělých sladidel a také nebyla pozorována deformace píků. Jako mobilní fáze se osvědčil octan amonný a acetonitril. Obě metody vyžadují jednoduchou přípravu vzorků, krátkou dobu analýzy, jsou vhodné pro kontrolu kvality a bezpečnosti potravin, a hlavně poskytují srovnatelné výsledky z hlediska přesnosti.

Výhodou HILIC oproti RP-HPLC je zvýšená retence silně polárních látek. Retenci lze nejlépe ovlivnit úpravou eluentu, tedy úpravou koncentrace organického rozpouštědla, kdy s rostoucí koncentrací se zvyšuje retence. S rostoucí koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi se také zlepšuje účinnost ionizace elektrosprejem v případě spojení s HPLC/MS.

Nicméně HPLC-MS a HPLC-MS/MS je stále nejpoužívanější metodou pro stanovení umělých sladidel, jelikož poskytují velice dobré výsledky pro všechny umělá sladidla i ve složitých směsích [39, 43, 45, 46, 56].

4.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie patří mezi techniky kapalinové chromatografie v plošném uspořádání, které jsou velmi jednoduché, levné a nenáročné na laboratorní vybavení. K separaci látek dochází na tenké vrstvě adsorbentu a využívá se hlavně adsorpční mechanismus dělení. Pokročilou formou klasické TLC je vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC). Hlavní rozdíl je ve snížení velikosti použitých částic sorbentu, což se projeví zvýšením účinnosti. Další výhodou je možnost současně separovat větší množství vzorků než na klasické TLC a některé kroky jsou automatizovány, například nanášení vzorků je možné provádět pomocí automatických dávkovačů. Výhodou je i menší spotřeba mobilní fáze při separaci. V tabulce 3 jsou uvedeny rozdíly pro porovnání desek v TLC a HPTLC [33, 36, 39, 57, 58].

Tabulka 3: Porovnání HPTLC a TLC desek [59]

	HPTLC	TLC
Střední velikost částic	5 – 7 μm	10 – 15 μm
Tloušťka tenké vrstvy	100 nebo 200 μm	250 μm
Max. počet vzorků na jedné desce	36 – 72	12
Vzdálenost migrace látek	30 – 70 mm	100 – 150 mm
Doba vyvíjení desek	3 – 20 min	30 – 200 min
Množství použitých rozpouštědel	5 – 10 ml	50 ml

Separace se provádí obvykle na skleněné destičce, na kterou se na jeden okraj v linii nanese vzorek. Následně se po vypaření rozpouštědla tento okraj ponoří do mobilní fáze, která postupně vzlíná pomocí kapilárních sil. Vzorek je nesen mobilní fází přes stacionární fázi tenkou vrstvou, kde se látky obsažené ve vzorku separují a migrují do různých vzdáleností. Látky, které se poutají méně na stacionární fázi, migrují rychleji. V okamžiku, kdy se mobilní fáze blíží k protějším konci, se deska vyjme z nádoby, označí se konec separace a deska se usuší. Podle poměru vzdálenosti mezi místem startu a středem skvrny a vzdálenosti mezi startem a koncem separace se vypočítá retardační faktor. Výsledný retardační faktor se porovná se standardem [33-35].

4.2.1 Instrumentace

V tenkovrstvé chromatografii je stacionární fází adsorbent nanesený v tenké vrstvě na destičce ze skla, plastu nebo hliníku. Nejčastěji využívaným nosičem je silikagel, který má na svém povrchu silanolové (Si-OH) skupiny, které tvoří adsorpčně aktivní povrchová centra, na kterých dochází k interakci látky s mobilní fází. Silikagel se často používá jak v adsorpční, tak rozdělovací chromatografii. Při tenkovrstvé chromatografii s obrácenými fázemi se používají hydrofobní modifikované sorbenty, na kterých je na silikagelu vázaná organická funkční skupina, nejčastěji oktylová (RP-8) nebo oktadecylová (RP-18). Stacionární fáze je upevněna na destičku pomocí pojiva, jako je škrob, sádra či organické polymery. Separační selektivitu je možné zlepšit impregnací. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla, které mají odlišnou polaritu stacionární fáze [33, 36, 39, 58].

Detekce se provádí po vysušení destiček. Separované látky můžeme detekovat pomocí fyzikálních, chemických a dalších metod. K detekci látek lze využít UV a viditelné záření či infračervené záření. Po ozáření desky dochází ke zviditelnění skvrn stanovovaných látek. Výhodou tohoto typu detekce je, že nemodifikují ani nepoškozují separovanou látku. Při detekci chemickými metodami se na chromatogram nastříká vhodné detekční činidlo, které látky na chromatogramu zbarví. Detekce se dále provádí hmotnostním spektrometrem, případně radiochemickými a biologickými metodami [33, 39, 58].

4.2.2 Vybraná HPTLC stanovení

Ve většině navržených postupů pro kvantitativní analýzu pomocí tenkovrstvé chromatografie se používají pro vyhodnocení skvrn denzitometrické metody, kdy se v místě skvrny vyhodnocuje intenzita ztmavnutí tenké vrstvy. Detekci pomocí denzitometrie zahrnuje postup navržený Nambiarem a kol. [60] pro kvantitativní stanovení pomocí HPTLC s normálními fázemi. Tento postup byl navržen pro současné stanovení čtyř umělých sladidel (SAC, ACK, ASP a NHDC), potravinářských barviv a konzervantů v potravinářských a farmaceutických výrobcích. Separace byla provedena na HPTLC destičkách potažených silikagelem a jako mobilní fáze byla vybrána směs acetonitril – ethylacetát – voda, přičemž po přidavku amoniaku se navíc významně zlepšil tvar píků. Výhodou denzitometrických detekcí je hlavně rychlost a spolehlivá kvantifikace. Kvantitativní analýza lze provést i nepřímým způsobem pomocí extrakce, kdy se skvrna jednotlivé látky extrahuje do vhodného rozpouštědla a následně se stanoví vhodnou metodou. Chareogekarem a kol. [61] navrhli postup pro kvantitativní stanovení pomocí HPTLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pomocí čerpadla se po separaci proudem rozpouštědla z destičky eluuje zóna obsahující separovanou látku a poté se

eluát přenesse do hmotnostního spektrometru. Výsledné hodnoty hmotnostních spekter odpovídaly hodnotám molárních hmotností stanovovaných umělých sladidel, takže navržená metoda je přesná, ale také jednoduchá a rychlá. Nicméně je důležité, aby byl vzorek ve skvrně na chromatogramu co nejčistší [34, 39].

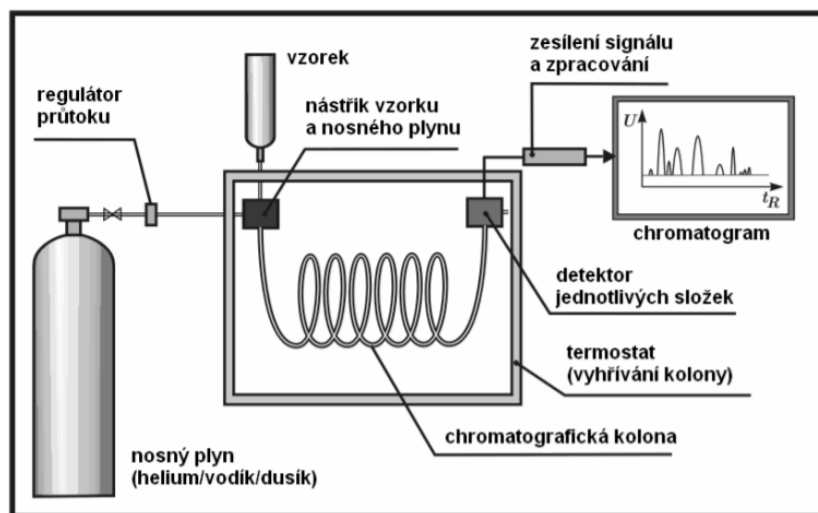
I když lze pomocí tenkovrstvé chromatografie dosáhnout celkem přesných výsledků, používá se spíše v málo vybavených laboratořích s omezenými zdroji financí. Dříve se tenkovrstvá chromatografie používala často, ale v dnešní době ji ve většině analýz nahradila HPLC [35, 60].

4.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je nejstarší chromatografická technika, při které dochází k separaci vzorku dle distribuce mezi plynnou mobilní fází a kapalnou nebo plynnou stacionární fází. Rozdílem oproti jiným chromatografickým metodám je, že mobilní fáze neinteraguje s molekulami analytu. Mobilní fází je v plynové chromatografii nosný plyn, který proudem unáší vzorek kolonou, nicméně je důležité, aby se samotný vzorek nejdříve přeměnil na plyn. Při průchodu kolonou se jednotlivé složky zdržují na základě rozdílných afinit. V plynové chromatografii rozlišujeme dva typy – adsorpční plynovou chromatografii (GSC) a rozdělovací plynovou chromatografii (GLC). Při adsorpční plynové chromatografii tedy dochází k separaci vzorku na pevné stacionární fázi, kde se jednotlivé složky vzorku zdržují pomocí fyzikální adsorpce. Při rozdělovací plynové chromatografii se rozděluje vzorek mezi plynnou mobilní fází a kapalnou stacionární fází, která je ukotvena na povrchu inertní pevné náplně nebo na stěnách kapiláry [33-36].

4.3.1 Instrumentace

První částí plynového chromatografu (obrázek 11) je tlaková láhev, která je zásobníkem nosného plynu. Nosný plyn musí být inertní látka (vodík, helium, dusík a argon), aby nedocházelo k reakci se složkami vzorku. Tlaková láhev je opatřena regulátorem tlaku a objemovým průtokoměrem k měření průtoku.



Obrázek 11: Schéma plynového chromatografu [62]

Další částí je dávkovač, kterým se vzorek dávkuje do proudu mobilní fáze. Na správném dávkování závisí přesnost výsledků a účinnost kolon. K dávkování se používají buď stříkačky nebo dávkovací ventily. Součástí může být i dělič vzorku, který umožňuje dávkování jen velmi malého množství vzorku.

V plynové chromatografii jsou kolony obvykle umístěny v termostatu. Používají se dva typy kolon – náplňové a kapilární. Náplňové jsou naplněny částicemi adsorbentu nebo pevným nosičem se zakotvenou kapalinou. Kapilární kolony zpravidla dělíme do tří skupin. Kapilární kolony WCOT mají kapalnou stacionární fázi na stěně kapiláry, SCOT mají na stěně kapiláry vrstvu nosiče, na kterém je zakotvena kapalná stacionární fáze a PLOT mají na stěně kapiláry vrstvu pórovitého materiálu. V dnešní době se obvykle používají kapilární kolony z důvodu vyšší účinnosti a možnosti dosáhnout vyšší rychlosti separace.

K detekci se používá mnoho detektorů a lze je dělit na základě rozdílné selektivity, kdy detektor reaguje pouze na určitou skupinu látek podobných svými vlastnostmi. Příkladem může být plamenově ionizační detektor (FID), tepelně vodivostní detektor (TCD) nebo detektor elektronového záchytu (ECD).

Mezi nejstarší detektory v plynové chromatografii patří TCD. Součástí tohoto detektoru je elektricky vyhříváný zdroj tepla, jehož teplota závisí na tepelné vodivosti procházejícího plynu. Samotný nosný plyn má určitou tepelnou vodivost, která se v přítomnosti složek vzorku mění. V důsledku změny tepelné vodivosti prostředí kolem žhavených drátů se mění i elektrické odpory, které se následně porovnávají. Výhodou TCD je jeho univerzálnost, jednoduchost a je nedestruktivní. Hlavní nevýhodou je vysoká mez detekce a menší citlivost.

Jedním z nejpoužívanějších detektorů je FID. Uvnitř detektoru dochází k ionizaci v důsledku spalování vzorku při průchodu vodíkovým plamenem. Při spalování složek vzorku se zvyšuje ionizace, čímž se mění elektrický proud, který se následně měří. Výhodou FID je vysoká citlivost hlavně na uhlovodíky. Při detekci se vzorek spaluje, a tím dochází k destrukci, což je jeho hlavní nevýhoda.

Dalším často používaným detektorem je detektor elektronového záchytu, kde v přítomnosti β -zářiče dochází k ionizaci nosného plynu za vzniku dalších elektronů. Pokud vzorek obsahuje elektronegativní skupinu (halogeny), dochází ke snadnému záchytu těchto elektronů, což způsobí pokles proudu, který lze zaznamenat měřicím zařízením. Výhodou je citlivost a nevýhodou omezení v lineárním dynamickém rozsahu (2 koncentrační řády).

Stejně jako v kapalinové chromatografii, tak i v plynové chromatografii je velice často využíváno spojení s hmotnostním spektrometrem [33-36].

4.3.2 Vybraná GC stanovení

Jelikož mají umělá sladidla nízkou těkavost, je nutné je nejdříve převést na těkavější analogy pomocí derivatizace, což ale prodlužuje a komplikuje jejich analýzu. Proto se pro stanovení umělých sladidel používá především HPLC. Dříve však byla plynová chromatografie alternativní technikou pro stanovení umělých sladidel bez chromoforu, takže většina postupů je navržena pro cyklamáty a sukralózu [6, 26].

Příkladem stanovení CYC může být postup pomocí plynové chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem, který navrhl M. Hashemi a kol. [63]. Postup je založený na přeměně cyklamátu na cyklohexanol a následné mikroextrakci. Před separací byla tedy provedena předkolonová derivatizace, kde byl cyklamát podroben reakci s dusitanem sodným v prostředí kyseliny sírové. Cyklohexanol vzniklý reakcí byl následně extrahován pomocí organického rozpouštědla (xylen). Pro nástřik byla zvolena teplota 220 °C, samotná separace byla provedena na kapilárních kolonách z taveného křemene a jako nosný plyn byl vybrán dusík. Pro detekci byl použitý detektor FID, jehož teplota byla 200 °C. Oproti dalším metodám je výraznou výhodou tohoto postupu nízká mez detekce a široký lineární dynamický rozsah, nicméně HPLC-MS [64] dosahuje lepších hodnot.

5 Závěr

I když si to možná neuvědomujeme, s umělými sladidly se většina z nás setkává každý den, jelikož jsou součástí velkého množství potravin, ale také například farmaceutických výrobků. Zároveň se často můžeme setkat s tím, že některá sladidla nepůsobí příliš bezpečně. Nicméně před uvedením na trh musí všechna sladidla procházet důkladným testováním na zvířatech, kdy by se měly odhalit všechny případné nežádoucí účinky. Některá sladidla vzbuzují pochybnosti ohledně karcinogenity, příkladem může být sacharin, neotam, cyklamát, ale hlavně aspartam. Nejvíce studií se zabývá právě možnou toxicitou aspartamu, důvodem však může být jeho popularita a mediální propagace. V několika studiích se karcinogenita opravdu prokázala, ale je důležité mít stále na paměti, že testované zvíře je vystaveno několikanásobně vyšší koncentraci, a proto se při testování na zvířatech může karcinogenita projevit. Pokud však konzumujeme umělá sladidla v množství, u kterého je prokázáno, že nemá negativní vliv na lidské zdraví, tak jsou umělá sladidla dle mého názoru bezpečná.

Dále tato práce pojednává o stanovení umělých sladidel pomocí chromatografických technik. V nejstarších postupech byla preferována kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickým detektorem, případnou alternativou byla plynová chromatografie. Z důvodů zvyšujících se nároků na potraviny se techniky postupně zdokonalovaly. První postupy byly navrženy pouze pro stanovení jednoho umělého sladidla, dnes jsou navrženy pro stanovení několika sladidel současně i ve složitějších směsích. S postupem času se stala oblíbenou technikou pro stanovení sladidel spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Pro separaci se zpravidla využívá chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, v posledních letech také narůstá počet analýz pomocí HILIC, kde lze dosáhnout lepší retence silně polárních látek, než je tomu u RP-HPLC. I přes tuto výhodu HILIC, obě metody poskytují srovnatelné výsledky.

6 Použitá literatura

- [1] LÜCK, Erich, VON RYMON LIPINSKI, Gert-Wolfhard. Food Additives. In: ELVERS, Barbara, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th completely rev. Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 671-692. Vol. 15. ISBN: 978-3-527-32943-4.
- [2] REINECCIUS, Gany, VICKERS, Zeta M. Flavor characterization. In: SEIDEL, Arza, ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 5th. ed. Hoboken (New Jersey): Wiley, 2004. s. 510-527. Vol. 11. ISBN 0-471-48521-7.
- [3] O'BRIEN-NABORS, Lyn, ed., 2016. *Alternative Sweeteners* [online]. CRC Press [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1201/b11242. ISBN 9780429109089. Dostupné z: <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780429109089>
- [4] KLESCHT, Vladimír, Iva HRNČIŘÍKOVÁ a Lucie MANDELOVÁ, 2006. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press. Zdraví pro každého (Computer Press). ISBN 978-80-251-1483-4.
- [5] YEBRA-BIURRUN, María C. Sweeteners. In: WORSFOLD, Paul, Alan TOWNSHEND a C. F. POOLE. *Encyclopedia of analytical science*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, c2005. s. 562-572. ISBN 0-12-764100-9.
- [6] VARZAKAS, Theodoros, Athanasios LABROPOULOS a Stylianos ANESTIS, ed., 2012. *Sweeteners* [online]. CRC Press [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1201/b12065. ISBN 9780429109959.
- [7] CAROCHO, Márcio, Patricia MORALES a Isabel C.F.R. FERREIRA, 2017. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **107**, 302-317 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.fct.2017.06.046. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517303642>
- [8] *Listy cukrovarské a řepařské* [online], 2008. 124. [cit. 2020-06-06]. ISSN 1805-9708. Dostupné z: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2008/pdf/278-279.PDF
- [9] VELÍŠEK, Jan, 2002. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS. ISBN 80-866-5902-X.
- [10] MAGNUSON, Bernadene A., Michael C. CARAKOSTAS, Nadia H. MOORE, Sylvia P. POULOS a Andrew G. RENWICK, 2016. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews* [online]. **74**(11), 670-689 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1093/nutrit/nuw032. ISSN 0029-

6643. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1093/nutrit/nuw032>

[11] Stanovisko FAO. *Česká společnost pro výživu a vegetariánství* [online]. [cit. 2020-06-07]. Dostupné z: <https://www.csvv.cz/index.php/vyziva/ekologie-vyzivy/stanovisko-fao/536-text-o-organizaci-fao>

[12] JECFA. *Bezpečnost potravin* [online]. Praha: Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství ČR [cit. 2020-06-07]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92358.aspx>

[13] Nařízení komise (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008. In: *Úřední věstník*. L 83, 22. 3. 2012, s. 1-295. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0231&qid=1623342502644&from=EN>

[14] Nařízení komise (EU) č. 497/2014 ze dne 14. května 2014, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 a příloha nařízení Komise (EU) č. 231/2012, pokud jde o použití advantamu jako sladidla. In: *Úřední věstník*. L 143, 15. 5. 2014, s. 6-13. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0497&qid=1623341899015&from=EN>

[15] VON RYMON LIPINSKI, Gert-Wolfhard. Sweeteners. In: ELVERS, Barbara, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th completely rev. Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011, s. 543-564. Vol. 35. ISBN: 978-3-527-32943-4.

[16] CLARKE, Margaret A. Sweeteners. In: TOWNSHEND, Alan, ed. *Encyclopedia of analytical science*. London: Academic Press, 1995. s. 5085-5096. Vol. 9. ISBN 0-12-226709-5.

[17] MITCHELL, Helen, ed., 2006. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology* [online]. Oxford, UK: Blackwell Publishing [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1002/9780470996003. ISBN 9780470996003. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470996003>

[18] LEE, Thomas D. Sweeteners. In: SEIDEL, Arza, ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 5th. ed. Hoboken (New Jersey): Wiley, 2004. s. 224-252. Vol. 24. ISBN 0-471-48521-7.

- [19] KVAPIL, Milan, 2014. Sladidlo aspartam: hrdina z bájí. *Vitalia: chytře na život* [online]. Praha: Vitalia.cz, 14. 1. 2014 [cit. 2021-6-10]. Dostupné z: <https://www.vitalia.cz/clanky/sladidlo-aspartam-hrdina-z-baji/>
- [20] Torunn A. Garin, 54, Noted Food Engineer, 2002. *The New York Times* [online]. 1 May 2002, 13 [cit. 2020-10-14].
- [21] NOŽIČKOVÁ, Lenka, 2008. Toxikologická rizika umělých sladidel. In: *Toxicology* [online]. [cit. 2020-06-07]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=169>
- [22] COLLINGS, A. J., 1989. Metabolism of Cyclamate and Its Conversion to Cyclohexylamine. *Diabetes Care* [online]. **12**(1), 50-55 [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.2337/diacare.12.1.50. ISSN 0149-5992. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.12.1.50>
- [23] Náhradní sladidla, jejich místo v současné diabetologii, 2012. *Interní medicína v praxi* [online]. (8-9), 331-335 [cit. 2020-10-14]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2012/09/09.pdf>
- [24] ANUSHKKARAN, Periyasamy, 2019. Artificial Sweeteners. *International Journal of Research and Review* [online]. **6**(1), 120-128 [cit. 2020-10-14]. ISSN 2349-9788. Dostupné z: http://ijrrjournal.org/IJRR_Vol.6_Issue.1_Jan2019/IJRR0019.pdf
- [25] POUZAR, Miloslav, 2018. Sacharin a příliš mnoho karcinogenů. *OSEL.CZ* [online]. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.osel.cz/10271-sacharin-a-prilis-mnoho-karcinogenu.html>
- [26] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK, 2009. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. **28**(9), 1082-1102 [cit. 2020-04-18]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.06.008. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993609001381>
- [27] NOFRE, C. Neotame: discovery, properties, utility. *Food Chemistry* [online]. **69**(3), 245-257 [cit. 2020-10-14]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(99)00254-X
- [28] Chemistry and Use of Artificial Intense Sweeteners, 2017. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [online]. **6**(6), 1283-1296 [cit. 2020-10-14]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.151>

- [29] OTABE, A., T. FUJIEDA, T. MASUYAMA, K. UBUKATA a C. LEE, 2011. Advantame – An overview of the toxicity data. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **49**, S2-S7 [cit. 2020-04-19]. DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.046. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511002900>
- [30] Scientific Opinion on the safety of advantame for the proposed uses as a food additive, 2013. *EFSA Journal* [online]. **11**(7) [cit. 2020-06-03]. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3301. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2013.3301>
- [31] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK, Agata KOT-WASIK a Jacek NAMIEŚNIK, 2011. Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **400**(7), 2159-2172 [cit. 2020-10-14]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-011-4937-z](https://doi.org/10.1007/s00216-011-4937-z)
- [32] TOWNSHEND, Alan. *Encyclopedia of analytical science*. Volume 9, Swe-Z. London: Academic Press, 1995. ISBN 0-12-226709-5.
- [33] CHURÁČEK, Jaroslav, 1990. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. ISBN 80-030-0569-8.
- [34] KLOUDA, Pavel, 2003. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-863-6907-2.
- [35] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH, 2019. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [36] DEYL, Zdeněk, ed., 1984. *Separation Methods*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 0-444-80527-3.
- [37] NAUSHAD, Mu a Mohammad Rizwan KHAN, ed., 2014. *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry* [online]. New York: CRC Press [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.1201/b16670. ISBN 9780429073953.
- [38] *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online], 1996. Praha [cit. 2020-10-16]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

- [39] *Encyclopedia of Chromatography* [online], 2009. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press [cit. 2020-06-07]. ISBN 9780429105432. Dostupné z: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429105432>
- [40] Elektrochemické HPLC detektory. *Hplc.cz* [online]. 8. dubna 2019 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html
- [41] KOKOTOU, Maroula, Alexandros ASIMAKOPOULOS a Nikolaos THOMAIDIS, 2012. Sweeteners. NOLLET, Leo a Fidel TOLDRA. *Food Analysis by HPLC, Third Edition* [online]. CRC Press, 2012-11-16, s. 493-514 [cit. 2020-06-07]. DOI: 10.1201/b13024-14. ISBN 978-1-4398-3084-0. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b13024-14>
- [42] MARRUBINI, Giorgio, Patrik APPELBLAD, Mariarosa MAIETTA a Adele PAPETTI, 2018. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chemistry* [online]. **257**, 53-66 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.03.008. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618304163>
- [43] JANDERA, Pavel. Hilic chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně--organických mobilních fázích. *Chemagazín, XXI* (2), 2011.
- [43] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2021-6-15]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-011-5308-5](https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5)
- [45] KNOLL, Sarah, Tobias RÖSCH a Carolin HUHN, 2020. Trends in sample preparation and separation methods for the analysis of very polar and ionic compounds in environmental water and biota samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **412**(24), 6149-6165 [cit. 2020-10-12]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-020-02811-5](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02811-5)
- [46] *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* [online], 2020. Darmstadt: Merck [cit. 2020-10-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/hilic.html>
- [47] KOKOTOU, Maroula G. a Nikolaos S. THOMAIDIS, 2018. Characterization of the Retention of Artificial Sweeteners by Hydrophilic Interaction Liquid

Chromatography. *Analytical Letters* [online]. **51**(1-2), 49-72 [cit. 2020-10-12]. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2017.1326124

[48] YANG, Da-jin a Bo CHEN, 2009. Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **57**(8), 3022-3027 [cit. 2020-10-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf803988u

[49] SEZGIN, Burcu, Göksel ARLI a Nafiz Öncü CAN, 2021. Simultaneous HPLC-DAD determination of seven intense sweeteners in foodstuffs and pharmaceuticals using a core-shell particle column. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. **97** [cit. 2021-04-07]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2020.103768

[50] BENVENUTI, Mark E., Gareth E. CLELAND a Jinchuan YANG, 2017. A Method for the Rapid and Simultaneous Analysis of Sweeteners in Various Food Products Using the ACQUITY Arc System and ACQUITY QDa Detector. *Waters* [online]. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/cz/en/library/application-notes/2017/method-for-rapid-and-simultaneous-analysis-of-sweeteners.html>

[51] WASIK, Andrzej, Josephine MCCOURT a Manuela BUCHGRABER, 2007. 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]. **1157**(1-2), 187-196 [cit. 2021-04-06]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.04.068

[52] DIVIŠ, Pavel, Zuzana JUREČKOVÁ, Milena VESPALCOVÁ, Jaromír POŘÍZKA a Lenka PUNČOCHÁŘOVÁ, 2020. Simultaneous determination of sweeteners and preservatives in beverages by HPLC-DAD-ELSD. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. **14**, 881-886 [cit. 2021-04-06]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: doi:10.5219/1339

[53] ŠTULÍK, Karel, 2004. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0852-9.

[54] MÉRILLON, Jean-Michel a Kishan Gopal RAMAWAT, ed., 2018. *Sweeteners* [online]. Cham: Springer International Publishing [cit. 2021-04-06]. Reference Series in Phytochemistry. ISBN 978-3-319-27026-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-27027-2

- [55] KUBICA, Paweł, Jacek NAMIEŚNIK a Andrzej WASIK, 2016. Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **127**, 184-192 [cit. 2021-04-06]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.01.006
- [56] KARTSOVA, L. A., E. A. BESSONOVA a V. D. SOMOVA, 2019. Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. **74(5)**, 415-424 [cit. 2020-10-16]. ISSN 1061-9348. Dostupné z: doi:10.1134/S1061934819050058
- [57] ANWAR, Jamil. Thin-layer chromatography. In: TOWNSHEND, Alan, ed. *Encyclopedia of analytical science*. London: Academic Press, 1995. s. 5174-5181. Vol. 9. ISBN 0-12-226709-5.
- [58] SHERMA, Joseph a Bernard FRIED, ed., 2003. *Handbook of Thin-Layer Chromatography* [online]. 3rd edition. New York: CRC Press [cit. 2020-10-15]. ISBN 9780203912430. Dostupné z: doi:10.1201/9780203912430
- [59] *HPTLC: Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie* [online]. Praha: Donau LAB Prague [cit. 2020-06-02]. Dostupné z: <https://www.efektivni-laborator.cz/hptlc>
- [60] NAMBIAR, Anargha P., Mallika SANYAL a Pranav S. SHRIVASTAV, 2018. Simultaneous densitometric determination of eight food colors and four sweeteners in candies, jellies, beverages and pharmaceuticals by normal-phase high performance thin-layer chromatography using a single elution protocol. *Journal of Chromatography A* [online]. **1572**, 152-161 [cit. 2020-04-25]. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.08.059. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967318310793>
- [61] CHAREGAONKAR, A. A. a V. V. VAIDYA, 2019. Chromatographic method for simultaneous identification of aspartame, saccharin and sucralose in traditional indian sweets samples by HPTLC and characterisation by HPTLC-MS. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences* [online]. **9(3)**, 138-145 [cit. 2020-10-14]. ISSN 2249-9504. Dostupné z: <https://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=2dfab632-b356-4397-906f-c90ae531a45b%40pdc-v-sessmgr01>

[62] Plynová chromatografia, 2001. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 28. 9. 2018 [cit. 2021-6-11]. Dostupné z: https://sk.wikipedia.org/wiki/Plynov%C3%A1_chromatografia

[63] HASHEMI, Mahdi, Ali HABIBI a Narges JAHANSHAH, 2011. Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. *Food Chemistry* [online]. **124**(3), 1258-1263 [cit. 2021-04-07]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.057

[64] HUANG, Ziqiang, Jinyu MA, Bo CHEN, Ying ZHANG a Shouzhuo YAO, 2006. Determination of cyclamate in foods by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. **555**(2), 233-237 [cit. 2021-04-07]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2005.09.030