

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Retenční chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s  
ternárními mobilními fázemi

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Holá**  
Osobní číslo: **C21425**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Retenční chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s ternárními mobilními fázemi**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. V teoretické části podejte přiměřený úvod do problematiky umělých sladidel. Popište používané typy sladidel, jejich vlastnosti a metody analýzy. Dále uveďte popis kapalinové chromatografie, zaměřte se zejména na systém chromatografie hydrofilních interakcí.
2. Na vybraných kolonách proměřte v systému chromatografie hydrofilních interakcí retenční chování sladidel v ternárních mobilních fázích obsahujících acetonitril, methanol a vodné roztoky vybraných těkavých aditiv. Zaměřte se také na studium vlivu složení mobilních fází na selektivitu separace a vliv složení mobilní fáze na detekci pomocí měření rozptylu světla.
3. U vybrané kolony na základě izokratických retenčních dat navrhnete a experimentálně ověřte gradientové profily vhodné pro úspěšnou separaci umělých sladidel.
4. Získaná data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Mgr. Miroslav Kubát**  
Katedra analytické chemie  
**Mgr. Barbora Tošovská**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Retenční chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s ternárními mobilními fázemi jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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

Bc. Kristýna Holá

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce, doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. a konzultantům Mgr. Barboře Tošovské a Ing. Mgr. Miroslavu Kubátovi za pomoc, podporu, pevné nervy a zpětnou vazbu při psaní této práce. Poděkování dále pak patří mé rodině a přátelům, kteří mě po dobu psaní diplomové práce i studia podporovali.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je věnována retenčnímu chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s ternárními mobilními fázemi. Retenční charakteristiky byly měřeny za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Analýzy byly prováděny jak v systému izokratické eluce, tak i gradientové. Cílem práce bylo zhodnotit potencionální vliv methanolu v kombinaci s mobilními fázemi obsahujícími acetonitril a vodný pufr na separaci umělých sladidel.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Umělá sladidla, ternární mobilní fáze, chromatografie hydrofilních interakcí

## **TITLE**

Retention behavior of artificial sweeteners in chromatography of hydrophilic interactions with ternary mobile phases

## **ANNOTATION**

The thesis is devoted to the retention behaviour of artificial sweeteners in chromatography of hydrophilic interactions with ternary mobile phases. The retention characteristics were measured using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer. Analyses were performed in both, isocratic elution and gradient systems. The aim of this work was to evaluate the potential effect of methanol in combination of acetonitrile/aqueous buffer mobile phases on the separation of artificial sweeteners.

## **KEYWORDS**

Artificial sweeteners, ternary mobile phases, chromatography of hydrophilic interactions

## **OBSAH**

ÚVOD .....	13
1. Sladidla .....	14
1.1. Pojem umělá sladidla a jejich historie .....	14
1.2. Cukr v porovnání s umělými sladidly .....	14
2. Rozdělení sladidel .....	16
2.1. Intenzivní sladidla .....	16
2.1.1. Sacharin .....	16
2.1.2. Aspartam .....	17
2.1.3. Acesulfam draselný .....	18
2.1.4. Sukralóza .....	18
2.1.5. Cyklamát .....	19
2.1.6. Neotam .....	19
2.1.7. Advantam .....	20
2.1.8. Některá další intenzivní sladidla .....	20
2.2. Vliv umělých sladidel na střevní mikrobiom a zdraví .....	21
2.3. Výživná sladidla .....	25
2.4. Analytické metody využívané ke stanovení umělých sladidel v potravinách .....	25
2.4.1. Příprava vzorku k analýze .....	25
2.4.2. Analytické metody .....	26
2.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	27
2.5.1. Detekce .....	28
2.5.2. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC) .....	30
2.6. Vybrané možnosti stanovení umělých sladidel v potravinách pomocí separačních technik .....	33
3. Experimentální část .....	36
3.1. Chemikálie .....	36
3.1.1. Standardy sladidel .....	36

3.2.	Přístrojové vybavení.....	36
3.2.1.	Kapalinový chromatograf s ELSD detekcí .....	37
3.2.2.	Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem.....	37
3.2.3.	Kolony .....	37
3.3.	Pracovní postup .....	38
3.3.1.	Příprava roztoku standardů .....	38
3.3.2.	Příprava mobilních fází.....	38
3.3.3.	Podmínky analýzy mimokolonových příspěvků.....	39
3.3.4.	Podmínky analýzy mrtvých časů kolon a jejich pórovitosti .....	39
3.3.5.	Nastavení hmotnostního spektrometru .....	39
4.	Výsledky a diskuse .....	40
4.1.	Analýza mimokolonových příspěvků pomocí kapalinové chromatografie s detektorem rozptylu světla a s detektorem diodového pole .....	40
4.1.1.	Mimokolonové příspěvky .....	40
4.1.2.	Mrtvé časy kolon a pórovitost kolon .....	41
4.1.3.	Retenční chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s ternárními mobilními fázemi .....	42
4.1.4.	Vyhodnocení dat .....	43
4.1.5.	Analýza směsi standardů pomocí gradientové eluce .....	45
	ZÁVĚR .....	50



## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Strukturní vzorec sacharózy .....	14
Obrázek 2: Strukturní vzorec sacharinu.....	17
Obrázek 3: Strukturní vzorec aspartamu .....	17
Obrázek 4: Strukturní vzorec acesulfamu draselného .....	18
Obrázek 5: Strukturní vzorec sukralózy .....	18
Obrázek 6: Strukturní vzorec cyklamátu sodného .....	19
Obrázek 7: Strukturní vzorec neotamu .....	20
Obrázek 8: Strukturní vzorec advantamu .....	20
Obrázek 9: Strukturní vzorec steviosidu.....	21
Obrázek 10: Extrakce tuhou fází, převzato a upraveno [41] .....	26
Obrázek 11: Analytické metody ke stanovení umělých sladidel, převzato a upraveno [42]....	27
Obrázek 12: Schéma kapalinového chromatografu, převzato a upraveno [44].....	28
Obrázek 13: Schéma aerosolového detektoru rozptylu světla, převzato a upraveno [44].....	29
Obrázek 14: Polární stacionární fáze s adsorbovanou vodnou difúzní vrstvou, převzato a upraveno [44].....	31
Obrázek 15: Příklady struktury stacionárních fází pro HILIC chromatografii, převzato a upraveno [52].....	32
Obrázek 16: Gradient č.1 na koloně YMC-Triart Diol.....	46
Obrázek 17: Gradient č.2 na koloně Luna Omega Sugar .....	47
Obrázek 18: Gradient č.2 na koloně InfinityLab Poroshell .....	48

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nejčastěji používaná umělá sladidla a roky jejich objevení [3,4,5] .....	14
Tabulka 2: Sladivost a E kód vybraných intenzivních sladidel [8] .....	16
Tabulka 3: Množství podávaných umělých sladidel, převzato a upraveno [31] .....	22
Tabulka 4: Příklady potravin a umělých sladidel podle vyhlášky č. 122/2011, převzato a upraveno [30,35] .....	24
Tabulka 5: Příklady cukerných alkoholů, jejich kalorické hodnoty, sladkosti a glykemického indexu, převzato a upraveno [2,36] .....	25
Tabulka 6: Složení mobilních fází .....	38
Tabulka 7: Statistická data pro výpočet složení mobilních fází .....	39
Tabulka 8: Mimokolonové příspěvky při různých průtocích mobilní fáze .....	41
Tabulka 9: Přehled vyzkoušených těkavých aditiv .....	43
Tabulka 10: Hodnoty selektivního monitorování iontů .....	43
Tabulka 11: Gradient číslo 1 .....	45
Tabulka 12: Gradient číslo 2 .....	45
Tabulka 13: Gradient číslo 3 .....	46

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACE-K – acesulfam draselný

ADI – adekvátní denní příjem

ADV – advantam

ASP – aspartam

C<sub>18</sub> – oktadecysilyl

C<sub>8</sub> – oktasilyl

CE – kapilární elektroforéza

CYK – cyklamát

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DAD – detektor diodového pole

EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin

ELSD – detektor rozptylu světla

ET – elektroanalytické techniky

EU – Evropská unie

FIA – průtoková injekční analýza

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GC – plynová chromatografie

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC – iontová chromatografie

MALDI – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

NEO – neotam

NP – HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi

PLE – extrakce vzorku kapalinou

RP – HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

SACH – sacharin

SFE – superkritická fluidní extrakce

SIM – selektivní monitorování iontů

SPE – extrakce tuhou fází

ST – spektroskopické techniky

SU – Sukralóza

TLC – tenkovrstvá chromatografie

US – umělá sladidla

USA – Spojené státy americké

UV/VIS – ultrafialová/ viditelná oblast

## ÚVOD

V současné době se pojem cukr stává „zakázaným“ slovem. Ve všech obchodech dnes můžeme najít potraviny s označením „zero“ nebo „low calorie“. V těchto produktech nejčastěji bývá cukr nahrazený umělými sladidly. Důvod je jasný – rostoucí obezita a vyšší výskyt diabetu druhého typu v populaci. Otázkou ale zůstává, zda snížená konzumace cukru a jeho nahrazení umělými sladidly může pomoci vyhrát boj s těmito nemocemi.

Umělá sladidla jsou synteticky vyrobené látky, které se vyznačují několásobně větší sladivostí, než má běžně dostupná sacharóza. Jejich historie sahá až do roku 1879, kdy bylo objeveno první sladidlo, a to sacharin. Prvotní myšlenkou zřejmě bylo najít látku, jež by osladila život i diabetikům. Nicméně dnes je tento problém stále na denním pořádku.

Ačkoliv jsou na trhu umělá sladidla již řadu let, o jejich bezpečnosti stále panují obavy. Proto je na místě neustále vyvíjet rychlé metody, které by tyto látky analyzovaly. Těchto metod byla vyvinuta již celá řada, od chromatografických metod až po biosenzory. Tato práce se zaměřuje na analýzu umělých sladidel pomocí chromatografie hydrofilní interakcí s detektorem rozptylu světla a hmotnostním detektorem.

Cílem této práce je zkoumat vliv použité ternární mobilní fáze na retenční chování umělých sladidel. Zkoumaná mobilní fáze se skládala z methanolu, acetonitrilu a octanového pufru.

# 1. Sladidla

## 1.1. Pojem umělá sladidla a jejich historie

Sladká chuť bez přijaté energie nebo pouze s minimální kalorickou hodnotou, takto lze shrnout skupinu chemických látek, která v dnešní době nahrazuje běžný cukr. Umělá sladidla (US) jsou řazena mezi potravinářská aditiva a jejich největší předností je nekolinásobně větší sladivost, než má běžný cukr (sacharóza) [1]. Důvodem vzrůstající poptávky po náhražkách cukru je rostoucí obezita a větší výskyt diabetu druhého typu v populaci. Těmto nemocem přispívá i nadměrná konzumace jednoduchých cukrů ve stravě, proto je snahou nahradit cukr nízkokalorickými sladidly. Avšak jejich zdravotní nezávadnost je stále předmětem diskusí [2].

Začátkem 19. století se začala na trh uvádět první umělá sladidla (tab. 1), ale jejich největší rozkvět nastal až v 21. století, kdy se začala objevovat i sladidla přírodního charakteru [3].

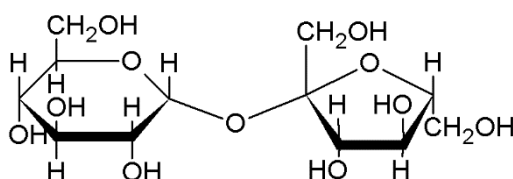
Tabulka 1: Nejčastěji používaná umělá sladidla a roky jejich objevení [3,4,5]

Sladidlo	Rok objevení
Sacharin	1879
Aspartam	1965
Acesulfam draselný	1967
Sukralóza	1976
Cyklamát	1937

Jedno z nejstarších přírodních sladidel je stévie (steviol-glykosidy), kterou používaly kmeny v Jižní Americe před několika staletími. I přes tato fakta byla stévie schválena Evropskou unií až v roce 2011 [5].

## 1.2. Cukr v porovnání s umělými sladidly

Stolní cukr neboli sacharóza (obr. 1) je disacharid složený z jednotek glukózy a fruktózy. Vyrábí se extrakcí z cukrové třtiny nebo cukrové řepy a obsahuje 4 kcal/g. Glykemický index sacharózy je 68, což je ukazatel nárstu hladiny glukózy v krvi po požití určité potraviny [6].



Obrázek 1: Strukturní vzorec sacharózy

Umělá sladidla, na rozdíl od běžného cukru, nemají žádný glykemický index ani kalorickou hodnotu. Jedinou výjimkou je zde aspartam, jenž obsahuje stejné množství kalorií jako cukr, ale díky jeho intenzivní sladivosti ho stačí použít pouze nepatrné množství [2,6]. Dalším odvětvím sladidel jsou cukerné alkoholy (polyoly), které mají většinou výživovou hodnotu a ovlivňují i hladinu glykémie, avšak méně než sacharóza [7].

## 2. Rozdělení sladidel

Sladidla rozdělujeme do dvou skupin. Můžeme je dělit na základě jejich původu na syntetická (umělá) a přírodní, nebo podle jejich interních vlastností na intenzivní a výživná [8].

### 2.1. Intenzivní sladidla

Charakteristickou vlastností sladidel je několásobně větší sladká chuť, než má cukr (tab. 2, kde × značí, kolikrát je větší sladivost ve srovnání se sacharózou) [8].

Tabulka 2: Sladivost a E kód vybraných intenzivních sladidel [8]

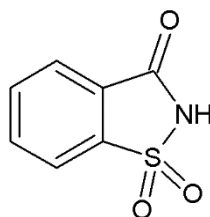
Název sladidla	E kód	Sladivost
Acesulfam draselný	950	150-200×
Advantam	969	37 000×
Aspartam	951	200×
Cyklamát	952	30-80×
Neotam	961	7 000-13 000×
Sacharin	954	240-300×
Sukralóza	955	400-800×

#### 2.1.1. Sacharin

Sacharin je nejstarší umělé sladidlo, které bylo velmi oblíbené ve 20. století během obou světových válek, kdy byl nedostatek cukru. Prochází naším trávicím traktem v nezměněné podobě, tudíž není využit jako zdroj energie [5]. Chemický název je 1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-on a jeho struktura je uvedena na obrázku 2. Ve své původní formě není příliš rozpustný ve vodě, častěji ho nalezneme ve formě sodné či vápenaté soli. Další nevýhodou je lehce nahořklá, až kovová pachut' [9]. Sacharin lze syntetizovat dvěma způsoby. Při prvním způsobu výroby se jako výchozí látka používá toluen, který reaguje s kyselinou chlorosulfonovou a amoniakem. Reakcí vzniknou dva sulfonamidy, přičemž pouze oxidací o-toulensulfonamidu vzniká sacharin. Ve druhém procesu se methylantranilát nechá reagovat postupně s diazotizačním činidlem, oxidem siřičitým, plynným chlórem a amoniakem [9,10]. V 70. až 80. letech 20. století se začaly objevovat články, které upozorňovaly na možnou karcinogenitu sacharinu. Jednalo se o rakovinu močového měchýře u zkoumaných hlodavců, kterým byly podávány po dlouhou dobu vysoké dávky sladidla. Projev rakoviny ale úzce souvisel s trávicím traktem zkušebních zvířat, proto byly tyto spekulace vyvráceny. Sacharin je



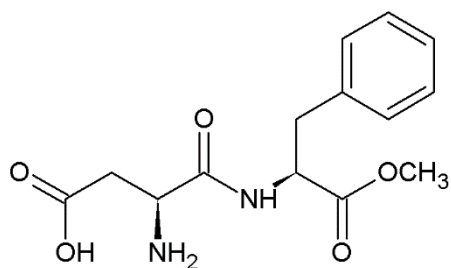
jedno z nejvíce prozkoumaných sladidel a považuje se za bezpečný při dodržení denní dávky 5 mg/kg pro dospělé i děti [4-5].



Obrázek 2: Strukturní vzorec sacharinu

### 2.1.2. Aspartam

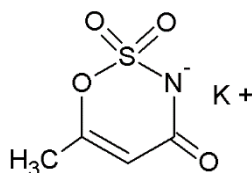
Aspartam je dipeptid, který se skládá z kyseliny L-asparagové a methylesteru L-fenylalaninu (obr. 3) [11]. Chemicky se vyrábí dvěma způsoby, přičemž oba spočívají ve spojení dvou aminokyselinových jednotek pomocí činidel, která mají za úkol chránit funkční skupiny (např. anhydrid kyseliny octové). Novou technologií je využití mikroorganismů, jejichž metabolismem z výchozích kyselin získáme aspartam [12]. Chutí se aspartam velmi podobá sacharóze [5], jeho rozpustnost ve vodě závisí na pH a teplotě, při vyšších teplotách degraduje [10-11]. Nehodí se do trvanlivých potravin, jelikož cyklizuje na cykloaspartylfenylalanin diketopiperazin, který není sladký [13]. Ve střevech se za pomoci enzymů (esterázy, proteázy) rozkládá na fenylalanin, kyselinu asparagovou a methanol, jenž běžně najdeme i v potravinách [11-12]. V důsledku rozpadu na fenylalanin není vhodný pro osoby, které trpí fenylketonurií [5]. Aspartam je jedno z nejvíce testovaných sladidel, často se spekuluje o jeho bezpečnosti z hlediska tvorby methanolu při jeho odbourávání. Tvzení, že by methanol přijatý z aspartamu měl být potenciálně karcinogenní a toxický bylo zavrhnuto. Methanol se přirozeně vyskytuje v běžných potravinách (rajčatová šťáva) a je tělu vlastní. Sklenice rajčatového džusu poskytne stejné množství methanolu jako sklenice nápoje slazená aspartamem. Ve více než 90 zemích na celém světě je aspartam povolený a považuje se za bezpečný. Doporučený denní příjem je v Evropské unii 40 mg/kg [5,10,14].



Obrázek 3: Strukturní vzorec aspartamu

### 2.1.3. Acesulfam draselný

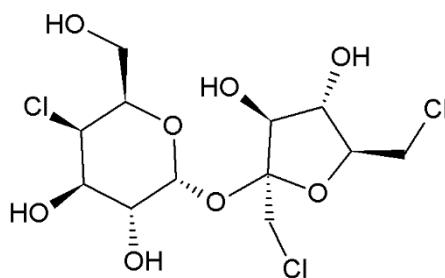
Acesulfam K je nejpoužívanější zkratka acesulfamu draselného, přesněji se jedná o draselnou sůl 6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on 2,2-dioxidu a jeho struktura je uvedena na obrázku 4. Je dobře rozpustný ve vodě a stabilní do cca 225 °C. Jeho nevýhodou je nahořklá chuť při vyšší koncentraci, a proto ho nejčastěji nalezneme ve směsi s ostatními sladidly [10,13,15]. První syntézy acesulfamu K používaly jako výchozí látky chlorosulfonyl nebo fluorosulfonyl isokyanát, který dále reagoval s kyselinou acetyloctovou a dalšími činidly. I přes velkou výtěžnost se od metod odstoupilo kvůli obtížné manipulaci a přípravě výchozích látek. Náhradní metoda spočívá v reakci acetoacidamidu s oxidem sírovým ve dvou po sobě jdoucích krocích. Výsledkem je oxathiazonový dioxid, který se neutralizuje hydroxidem draselným za vzniku acesulfamu K [10,16]. Více než 90 studií se shodlo na tom, že acesulfam draselný je bezpečné sladilo. V Evropské unie je doporučený denní příjem 9 mg/kg [17].



Obrázek 4: Strukturální vzorec acesulfamu draselného

### 2.1.4. Sukralóza

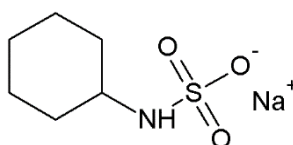
Sukralóza je strukturálně podobná sacharóze. Připravuje se selektivní substitucí hydroxylových skupin sacharózy za atomy chlóru [18]. Celý chemický název je 1,6-dichlor-1,6-dideoxy-β-D-fruktofuranosyl-4-chlor-4-deoxy-α-D-galaktopyranosid a struktura je uvedena na obrázku 5 [19]. Pro lidské tělo není vstřebatelná, většina sukralózy odchází v nezměněné podobě a menší část jako glukuronidové konjugáty [18]. Vyznačuje se čistě sladkou chutí [13]. Sukralóza je tepelně stabilní a dobře rozpustná ve vodě, proto ji můžeme najít v mnoha potravinách i lécích [13,18,20]. Jedná se o bezpečné a dobře prozkoumané sladilo, doporučený denní příjem v Evropské unii je 15mg/kg [19-20].



Obrázek 5: Strukturální vzorec sukralózy

### 2.1.5. Cyklamát

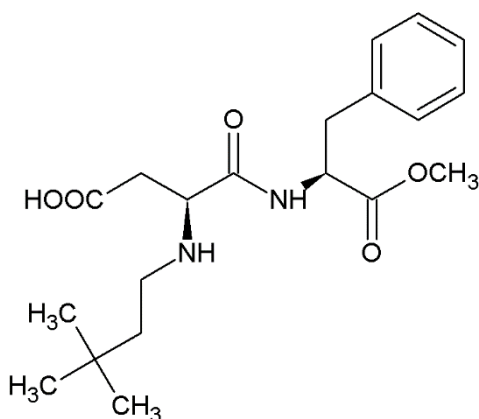
Cyklamát je sodná nebo vápenatá sůl kyseliny cyklohexylsulfamové [10,21]. Struktura cyklamátu sodného je na obrázku 6. Cyklamát je dobře rozpustný ve vodě a má lehce nakyslou chuť. Nejčastěji ho v potravinách najdeme společně se sacharinem. Sám o sobě je neškodný, bohužel u některých jedinců se ve střevech cyklamát přeměňuje na toxický cyklohexylamin. Ačkoliv nejnovější poznatky ukazují na to, že konverze na cyklohexylamin se nejspíše děje pouze při dlouhodobém užívání, stále není cyklamát povolen v USA. Jedná se o jedno z nejkontroverznějších sladidel, které mělo, podobně jako sacharin, způsobovat rakovinu. I toto tvrzení bylo vyvráceno. I přes možnou konverzi na cyklohexylamin je v České republice povolen [5,8,10,21]. Denní doporučený příjem v Evropské unii je 7 mg/kg [22].



Obrázek 6: Strukturní vzorec cyklamátu sodného

### 2.1.6. Neotam

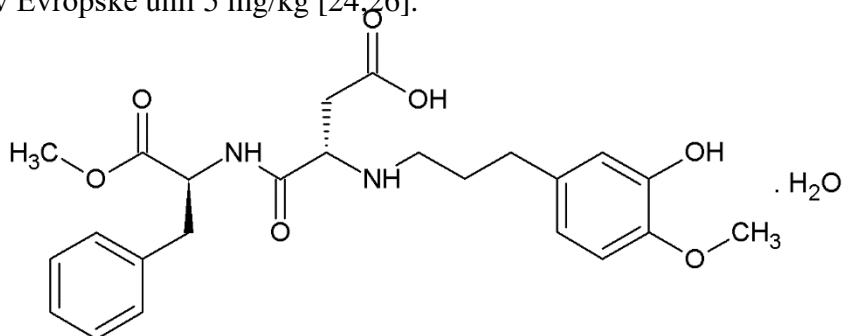
Neotam je derivát aspartamu, který se vyznačuje lepší sladkou chutí a byl objeven v roce 1991. Chemický název je N-[N-(3,3-dimethylbutyl)-L- $\alpha$ -aspartyl]-L-phenylalanin 1-methylester a jeho struktura je zobrazena na obrázku 7. Vyrábí se z aspartamu a 3,3-dimethylbutyraldehydu redukční N-alkylací s palladiem nebo platinou jako katalyzátorem. Nereaguje s redukujícími cukry ani aromatickými látkami, je stabilní a rozpustný ve vodě [13,23]. Po požití se v trávicím traktu absorbuje pouze 20-30 % neotamu. Je rychle metabolizován, vylučován a v lidském těle se nehromadí. Hlavními metabolity jsou methanol a fenylalanin. Vyskytují se ale v mnohem menší míře než u aspartamu, proto je neotam vhodný i pro populaci, která trpí fenylketonurií. Neotam se považuje za netoxické sladidlo, které je schváleno v USA i v Evropě, kde je doporučený denní příjem 2 mg/kg [8,10,13,22].



Obrázek 7: Strukturální vzorec neotamu

### 2.1.7. Advantam

Další derivát aspartamu, jenž se strukturálně podobá neotamu je advantam [24]. Byl objeven v roce 2008 [25]. Jeho struktura je zobrazena na obrázku 8. Chemický název je N-[N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)propyl]- $\alpha$ -aspartyl]-L-fenylalanin-1-methylester monohydrát [26]. Advantam dominuje sladkou chutí, je vhodný do široké škály potravin včetně takových, které mají nízkou hodnotu pH nebo vyžadují tepelné zpracování o vysoké teplotě [24]. Rozpustnost ve vodě závisí na pH a teplotě [26]. Vyrábí se redukční N-alkylací aspartamu a 3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)propanalu v prostředí vodíku s platinou jako katalyzátorem [27]. Jen malá část advantamu ve formě kyseliny je absorbována v gastrointestinálním traktu. Metabolit se nehromadí a je rychle vylučován z těla převážně ve stolici. Tvorba methanolu a fenylalaninu je zanedbatelná. Advantam se jeví jako bezpečné sladidlo bez genotoxických nebo karcinogenních účinků, avšak většina studií je založena na pokusech u zvířat. Doporučený denní příjem je v Evropské unii 5 mg/kg [24,26].



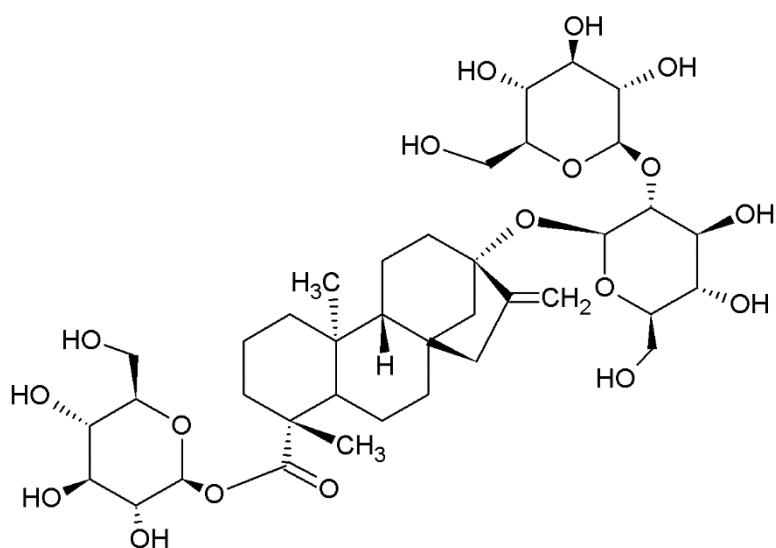
Obrázek 8: Strukturální vzorec advantamu

### 2.1.8. Některá další intenzivní sladidla

Dulcin (4-ethoxyfenylmočovina) je umělé sladidlo, které se v minulosti používalo společně se sacharinem. Dnes se již nepoužívá z toxikologických důvodů. Neohesperidindihydrochalkon se

vyrábí katalytickou redukcí neohesperidinu, což je glykosid flavonů. Má příjemnou sladkou chuť, jež dlouho přetrvává a pomalu nastupuje. Je 500 - 2000krát sladší než sacharóza [28]. Alitam je dipeptid složený z kyseliny L-asparagové a modifikovaného D-alaninu. Je 2000krát sladší než sacharóza. Alitam je schválený k užívání v Mexiku, Kolumbii, Číně, Austrálii a na Novém Zélandu [10].

Jedno z nejpoužívanějších intenzivních sladidel dnešní doby jsou steviol – glykosidy (E 960). Získávají se extrakcí horkou vodou a následnou rekrystalizací z listů rostliny *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Stéviové glykosidy obsahují různé směsi aktivních látek např. steviosid (obr. 9), rebaudiosid A (nejsladší sloučenina), rebaudiosid C, dulkosid A. Sladivost je 250 – 300krát větší než u sacharózy a obsahuje zanedbatelná množství kalorií. Je vhodná pro tepelnou úpravu a pro osoby trpící fenylylketonurií i diabetiky. Řadí se mezi bezpečná sladidla a její adekvátní denní příjem (ADI) je 4 mg/ kg. Toto množství lze konzumovat denně po celý život bez újmy na zdraví [5,8,22].



Obrázek 9: Strukturní vzorec steviosidu

## 2.2. Vliv umělých sladidel na střevní mikrobiom a zdraví

Všechna umělá sladidla musí projít důkladným hodnocením bezpečnosti před uvedením na trh. V Evropské unii o přijetí sladila rozhoduje zejména Evropská komise, parlament, rada a členské státy. Hodnocení rizik a stanovení ADI provádí tzv. panel EFSA. Po potvrzení bezpečnosti se k příslušnému sladidlu přiřadí E kód, který jej identifikuje na potravinách [29]. Dříve se umělá sladidla mohla používat pouze do některých potravin, jež stanovila vyhláška č.

122/2011 Sb., příklady jsou uvedené v tabulce 4. Později však byla zrušena a nahrazena vyhláškou č. 253/2018 Sb., který již žádné potraviny nevymezuje [30].

Často diskutovaným tématem v oblasti bezpečnosti umělých sladidel je jejich vliv na střevní mikrobiom. Jedna z nejnovějších studií od *Suez a kol. (2022)* zkoumala vliv sacharinu, aspartamu, sukralózy a stévie na střevní bakterie a hladinu krevního cukru. Výzkum měl tři fáze. První byla určena k měření metabolických parametrů participantů, ve druhé fázi se po dobu 14 dnů podávala osobám umělá sladidla a v poslední se sledovaly změny po vysazení US. Studie se účastnilo 120 osob, které nikdy nekonzumovaly umělá sladidla. Účastníci byli rozděleni do šesti skupin po 20 lidech. Čtyři skupiny konzumovaly konkrétní sladidlo společně s glukózou, kontrolní skupina glukózu a poslední nedostávala nic. Množství podávaného sladidla bylo pod hranicí přijatelné denní dávky (ADI), konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3. V průběhu dvou týdnů si všichni účastníci pravidelně ráno v domácích podmínkách dělali orální glukózový toleranční test. Ukázalo se, že skupina, jež konzumovala sacharin a sukralózu měla prudší nárůst glykémie oproti ostatním skupinám. Dále výzkumníci provedli transplantaci mikrobiomu účastníků do myši, které nemají osídlená střeva bakteriemi. Myši, jež dostaly bakterie od skupin, kde byl nárůst glykémie největší, vykazovaly podobnou reakci. U všech skupin, které konzumovaly umělá sladidla došlo ke změně mikrobiomu, respektive metabolických produktů bakterií [31].

*Tabulka 3: Množství podávaných umělých sladidel, převzato a upraveno [31]*

	Stévie	Sukralóza	Sacharin	Aspartam
počet sáčků/den	6	6	6	6
mg/den	180	102	180	240
ADI (mg/kg/den)	4	5	15	50

Podobná publikace od stejného autora vyšla již v roce 2014. V této studii se zabývali vlivem aspartamu, sacharinu, sukralózy na střevní mikrobiom a glukózovou intoleranci u myši. Sladidla jim byla podávána ve vodě společně s glukózou (př. 5 % sacharinu a 95 % glukózy). Srovnávací skupina myši pila buď čistou vodu nebo vodu s glukózou či sacharózu. V průběhu 11 týdnů byla zaznamenána intolerance na glukózu u hladovců, kteří pili US, přičemž největší efekt měl sacharin. Dále byl zkoumán vliv pouze samotného sacharinu se stejnými výsledky. Sacharin dále ovlivňoval i metabolismus střevních bakterií [32].

Střevní mikrobiom se pravděpodobně mění každý den a ovlivňuje ho mnoho faktorů, především strava. V roce 2019 *Lobach a kol.* provedli přezkoumání všech dosavadních studií, které se týkaly vlivu umělých sladidel na střevní mikrobiom. Studie zkoumala sladidla jako je acelsufam draselný, sacharin, sukralóza, cyklamát, aspartam nebo neotam. Vědci došli k závěru, že při konzumaci doporučených denních dávkách není žádný jasný důkaz o tom, že US ovlivňují naše střevní bakterie. Přesto, že se objevují studie o negativních účincích, často je problém s interpretací dat nebo s použitou dávkou sladidla [33].

Vlivem umělých intenzivních sladidel na inzulínovou rezistenci se dále zabývali např. *Dalenberg a kol. (2020)*, již zkoumali vliv sacharózy, samotné sukralózy, a její kombinace s maltodextrinem. Studie se zúčastnilo 45 lidí, kteří neužívali US a paralelně se sledovala i skupina adolescentů. Po dobu dvou týdnů zcela náhodně konzumovali nápoje oslazené buď 0,06 g sukralózy, anebo 30,38 g sacharózy, nebo 0,06 g sukralózy s 31,83 g maltodextrinu. Výsledky ukázaly, že nejhorší vliv na metabolismus glukózy, respektive sníženou citlivost na inzulín měla kombinace sukralózy a maltodextrinu. Doba experimentu byla krátká na vyvození závěru, navíc bylo zkoumáno pouze jedno US [34].

Ačkoliv kolem umělých sladidel panují stále jisté obavy, podle dosavadních důkazů jsou považována za nekarcinogenní a bezpečná. Naopak mohou poskytnou některé benefity. Pokud obézní člověk, který si nemůže odpustit slazené nápoje, vyhledá jejich nekalorické varianty (s umělými sladily), může tím snížit svůj energetický denní příjem. Je nutné podotknout, že pokud chceme žít zdravě, náš pitný režim by měla tvořit hlavně voda. Umělá sladidla mohou pomáhat diabetikům, jelikož nezvyšují hladinu cukru v krvi. Nepodporují vznik zubního kazu. Skupiny, které by měly být obezřetné ke konzumaci US, jsou děti, těhotné a kojící ženy [5].

Tabulka 4: Příklady potravin a umělých sladidel podle vyhlášky č. 122/2011, převzato a upraveno [30,35]

Umělé sladidlo	Potravina
Acesulfam draselný	Žvýkačky
	Cukrovinky bez přidaného cukru
	Nealkoholické pivo
Aspartam	Žvýkačky
	Ovocné šťávy se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru a nápojové koncentráty pro přípravu těchto nápojů
Neotam	Ochucené nápoje na bázi vody se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru
	Džemy, rosoly a marmelády se sníženou energetickou hodnotou
	Snacky v podobě ochucených balených suchých výrobků na bázi škrobu a ořechů s plevou
Cyklamát sodný nebo vápenatý	Pomazánky na bázi kakaa, mléka, sušeného ovoce nebo tuku se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru
	Ovocné kompoty se sníženou energetickou hodnotou nebo bez přidaného cukru
Sacharin a jeho soli	Ovoce a zelenina ve sladkokyselém nálevu
Sukralóza	Kornouty a oplatky k mraženým krémům bez přidaného cukru



## 2.3. Výživná sladidla

Přírozně se vyskytující sladké látky v potravinách jsou např. monosacharidy, disacharidy a cukerné alkoholy. Jsou zdrojem energie a řadíme je mezi výživná sladidla [28]. Cukerné alkoholy jsou organické sloučeniny podobné cukrům, mají na každém uhlíku pouze připojenou hydroxylovou skupinu. V potravinářství se používají jako zahušťovadla a sladidla. Jsou rozpustné ve vodě, vhodné k tepelné úpravě a chutí se podobají sacharóze. Často je nalezneme v kombinaci s intenzivními sladidly, kde maskují jejich pachutí. Přírozně se vyskytují např. v houbách, ovoci a zelenině. Průmyslově se vyrábí hydrogenací cukrů, enzymatickými nebo biotechnologickými procesy [36, 37], např. erythritol se získává kvašením *Trichosporonoides megachiliensis* z glukózy a sacharózy [2]. Jsou vhodné pro diabetiky, jelikož neovlivňují hladinu krevního cukru tolik jako běžný cukr (sacharóza), nepodílí se na vzniku zubního kazu. Nejčastěji používaný cukerný alkohol je sorbitol a xylitol. Jejich nevýhodou jsou gastrointestinální potíže při nadměrné konzumaci [36,2]. V tabulce 5 jsou shrnuty základní informace o nejznámějších cukerných alkoholech.

Tabulka 5: Příklady cukerných alkoholů, jejich kalorické hodnoty, sladkosti a glykemického indexu, převzato a upraveno [2,36]

Název cukerného alkoholu	Sladkost v % vůči sacharóze	kcal/g	Glykemický index
Erythritol	70	0,2	0
Maltitol	75	2,7	35-52
Xylitol	100	2,5	12-13
Sorbitol	60	2,5	9

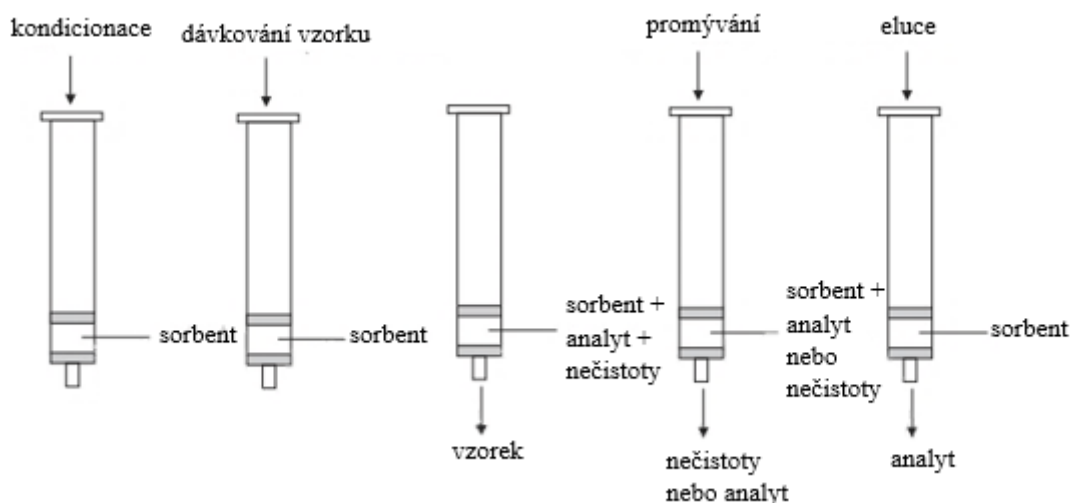
## 2.4. Analytické metody využívané ke stanovení umělých sladidel v potravinách

### 2.4.1. Příprava vzorku k analýze

Prvním krokem při analýze umělých sladidel je příprava vzorku. Potraviny jsou složité matrice, které obsahují sacharidy, tuky, bílkoviny, konzervanty a další stopové látky. Všechny tyto složky, jež by mohly rušit stanovení, musí být před vlastní analýzou odstraněny [38]. K odstranění tuků, bílkovin nebo emulgátorů lze použít Carrezova činidla [39]. V dnešní době se hlavně využívají extrakční metody jako superkritická fluidní extrakce (SFE), extrakce vzorku kapalinou (PLE) a nejčastěji extrakce tuhou fází (SPE). Zejména v případě pevných

vzorků je nutné provést extrakci. Pokud vzorek obsahuje nízkou koncentraci sladidel, je potřeba po extrakci analyt zakonzentrovat a přechistit [38].

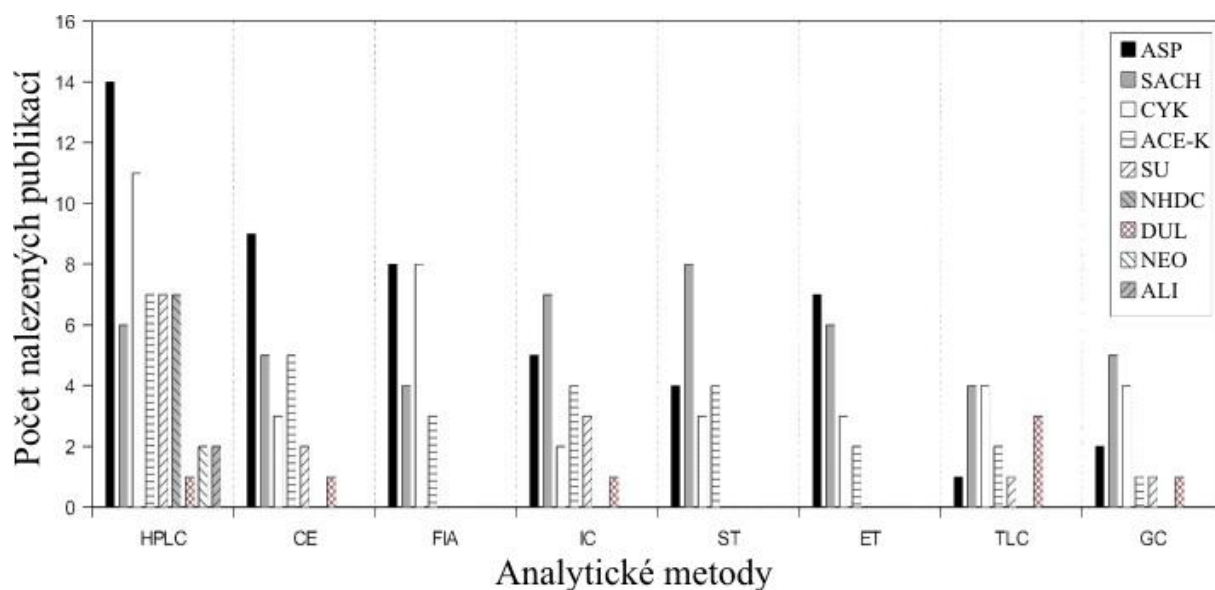
Pro extrakci tuhou fází je zásadní výběr sorbentu. Výběr sorbentu pro extrakci umělých sladidel je značně komplikovaný, jelikož se jedná o různorodé sloučeniny s rozmanitou škálou polarit (peptidy, sulfamáty, glykosidy). Jako nejvhodnější sorbent se jeví oktadecylsilikagel ( $C_{18}$ ), v případě dipeptidových US je možné použít styren-divinylbenzen. Prvním krokem při SPE je kondicionace methanolem a příslušným pufrem (složení, pH). Následuje dávkování vzorku, promývání a eluce methanolem (obr. 10) [40].



Obrázek 10: Extrakce tuhou fází, převzato a upraveno [41]

#### 2.4.2. Analytické metody

Existuje široká škála metod pro stanovení umělých sladidel (obr. 11), při kterých se uplatňují různé fyzikálně – chemické principy. Jedna z nejoblíbenějších technik je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s reverzní fází. Další použitelné separační techniky jsou iontová chromatografie (IC) [42], micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), tenkovrstvá chromatografie a plynová chromatografie, kde je zapotřebí derivatizace [38]. Elektromigrační techniky lze ke stanovení US také použít např. kapilární zónovou elektroforézu (CZE). Dále lze využít UV/VIS spektrometrii nebo infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) [38,42].

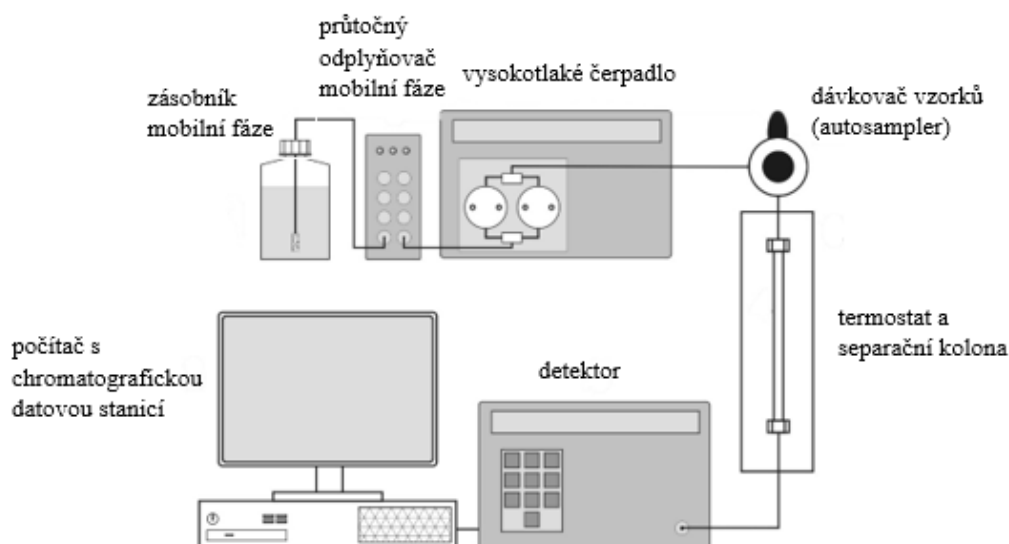


Obrázek 11: Analytické metody ke stanovení umělých sladidel, převzato a upraveno [42]

CE – kapilární elektroforéza, ET – elektroanalytické techniky, FIA – průtoková injekční analýza, GC – plynová chromatografie, HPLC – vysoce účinná kapalinová chromatografie, IC – iontová chromatografie, TLC – tenkovrstvá chromatografie, ST – spektroskopické techniky, ASP – aspartam, SACH – sodná sůl sacharinu, CYK – cyklamát sodný, ACE-K – acesulfam draselný, SU – sukralóza, NHDC – neohesperidin, DUL – dulcin, NEO – neotam, ALI – alitam

## 2.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V 60. letech 20. století se z klasické kolonové kapalinové chromatografie vyvinula vysokoúčinná, dříve nazývaná vysokotlaká, kapalinová chromatografie. Jedná se o jednu z nejefektivnějších analytických metod, kterou lze využít i jako preparativní metodu [43]. HPLC pracuje v kontinuálním uspořádání. při němž se dosahuje tlaku až 40 MPa. Vzorek se dávkuje přímo do mobilní fáze, prochází kolonou a eluát je přiváděn na detektor. Schéma kapalinového chromatografu je na obrázku 12 [44].



Obrázek 12: Schéma kapalinového chromatografu, převzato a upraveno [44]

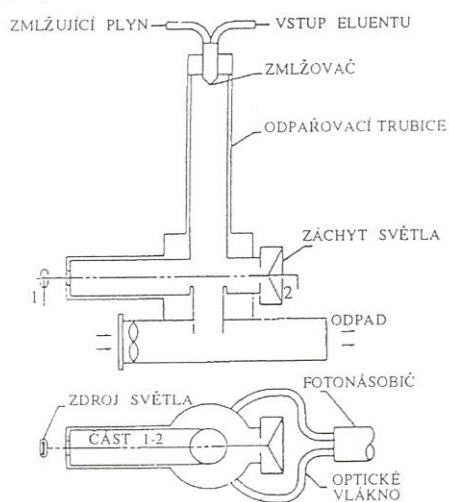
Princip separace je založen na rozdílné distribuci látek mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Volba stacionární fáze ovlivňuje selektivitu, rozlišení, účinnost a čas analýzy. V závislosti na polaritě mobilní a stacionární fáze rozlišujeme dva typy uspořádání HPLC. První typ se označuje jako systém s normálními fázemi (NP-HPLC), kdy je stacionární fáze polární adsorbent (oxid křemičitý nebo jeho modifikace) a mobilní fáze je nepolární rozpouštědlo (hexan). Uspořádání se využívá například při analýze polyfenolů, karotenoidních pigmentů nebo antioxidantů. Druhý typ je znám jako systém s reverzní (obrácenou) fází (RP-HPLC), při čemž je mobilní fáze polární (voda, methanol, acetonitril) a stacionární fáze méně polární (oxid křemičitý s C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>). Systém nachází široké uplatnění při analýze různých typů sloučenin (rostlinné bílkoviny, vitamíny). Při RP-HPLC se uplatňují hydrofobní interakce mezi stacionární fází a analytem, látky eluují v pořadí klesající polarity. Pokud budeme zvyšovat polaritu mobilní fáze, prodloužíme tím retenci analytů v koloně. Naopak při NP-HPLC látky eluují v pořadí rostoucí polarity [43,45]. Pro zlepšení rozlišení látek a zrychlení doby analýzy lze využít gradientovou eluci. Principem je naprogramovaná změna složení mobilní fáze v určitém čase [43,44].

### 2.5.1. Detekce

Volba detektoru pro HPLC závisí na jeho citlivosti k danému analytu (koncentraci), lineárnímu rozsahu a komptabilitě s elučním systémem [43]. Detektory můžeme dělit na základě jejich odezvy na diferenciální a integrální. Diferenciální detektor zaznamenává změnu složení eluentu, jenž vyháží z kolony a integrální množství vzorku, které projde detektorem.

Další dělení je podle selektivity [46]. Selektivní detektory využívané při HPLC jsou spektrofotometrický (UV/VIS, fotodiodové pole), fluorimetrický a elektrochemický (amperometrický, coulometrický, vodivostní). Univerzální detektory pro látky, které nemají fyzikálně – chemické vlastnosti umožňující selektivní detekci, jsou refraktometrický, aerosolový detektor rozptylu světla. Dále je možné spojit HPLC s hmotnostní spektrometrií [43,44,46].

Mechanismus aerosolového detektoru rozptylu světla (ELSD) se skládá ze tří procesů. Mobilní fáze s analytem vstupující na detektor se smísí s proudem vzduchu nebo dusíku za vzniku aerosolové mlhy (rovnoměrný rozptyl kapiček). Vzniklý aerosol přejde do vyhřívané trubice, kde se odpaří mobilní fáze. Suché částice opouštějí trubici a jsou ozářeny světelným zdrojem. Rozptyl světla na částicích je detekován fotomultiplikátorem nebo fotodiodou (obr. 13). Množství rozptýleného světla je úměrné koncentraci analytu [47].



Schema detektoru rozptylu světla (ELSD)

Obrázek 13: Schéma aerosolového detektoru rozptylu světla, převzato a upraveno [44]

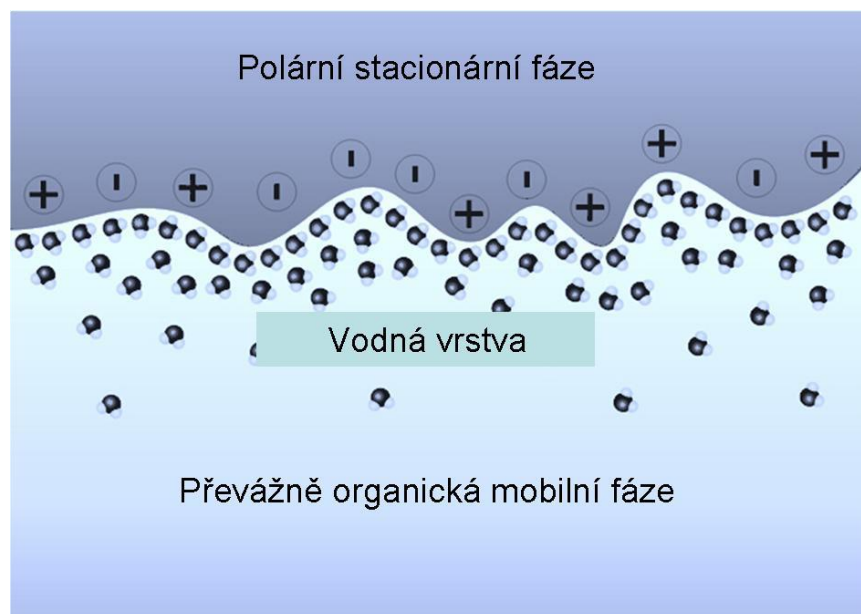
V dnešní době je velmi využívané spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrií. Spojení těchto dvou technik bylo značně obtížné. Problém byl u složení mobilní fáze, a i s některými vlastnostmi separovaných látek kapalinovou chromatografií. Proto při volbě chromatografických podmínek musíme dbát na složení mobilní fáze, která musí být těkavá. Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jež je založena na interakci iontů s elektrickým nebo magnetickým polem. Základní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, vakuový systém a řídicí jednotka. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na ionty. Pro plynné vzorky se využívají ionizační techniky jako

elektronová nebo chemická ionizace. Pro vzorky v kapalném skupenství je možné použít elektrosprej, chemickou ionizaci a fotoionizaci za atmosférického tlaku. Nejdůležitější technikou pro pevné vzorky je laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI). Pro rozdělení jednotlivých iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje slouží hmotnostní analyzátoři. Ty využívají různé fyzikální principy a je jich celá řada např. magnetický analyzátoř, kvadrupól, analyzátoř doby letu nebo Orbitrap. Detektor slouží k převodu intenzity iontového toku na elektricky měřitelnou veličinu, k čemuž se využívají elektronásobiče [44,48].

### **2.5.2. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC)**

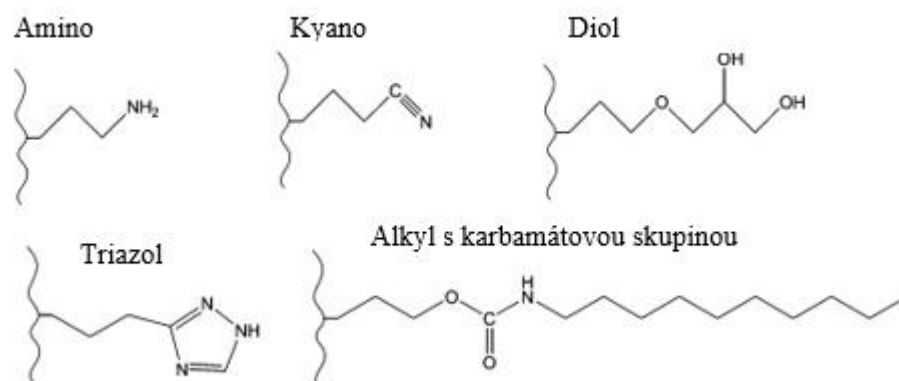
V roce 1990 byla poprvé použita definice hydrofilní interakční chromatografie. Jedná se o systém, kde stacionární fáze je polární a mobilní fáze se skládá z organického rozpouštědla a vody. Postupem času se z HILIC stala jedna z nejpreferovanějších technik pro analýzu polárních látek. Nachází uplatnění ve farmaceutické chemii, medicíně, analýze potravin, proteomice, zemědělství a dalších odvětvích [49]. Výhoda HILIC spočívá v lepší selektivitě a vyšší retenci polárních i iontových látek, které se při běžné RP-HPLC v koloně téměř nezadrží [50].

Ačkoliv je metoda hojně využívána, retenční mechanismus není dosud zcela znám [49]. Nejuznávanější model (obr. 14) popisuje retenční mechanismus jako interakci eluentu s vodnou složkou mobilní fáze, která je imobilizovaná na polární stacionární fázi [50]. Vodná složka by měla tvořit „vodnou difúzní vrstvu“, jež nemá ostré hranice a koncentrace vody se postupně snižuje z pevného povrchu směrem k mobilní fázi. Na vodnou difúzní vrstvu má vliv teplota, druh stacionární fáze a iontová síla mobilní fáze. Vzniká v důsledku interakcí mezi ionizovanými skupinami stacionární a mobilní fáze, přičemž se uplatňuje vodíková vazba, dipól-dipól interakce a elektrostatické síly [49,51].



*Obrázek 14: Polární stacionární fáze s adsorbovanou vodnou difúzní vrstvou, převzato a upraveno [44]*

Stacionární fáze používané při HILIC chromatografii nehrají pouze roli nosiče vodné difúzní vrstvy, ale také se aktivně podílejí na separaci [50]. Nejčastěji používaná stacionární fáze je silikagel, přesněji sférické částice oxidu křemičitého typu B, které se vytváří agregací oxidu křemičitého na vzduchu. Vyznačuje se stabilitou až do pH 9, účinnosti částic se zlepšuje s jejich zmenšující se velikostí. Pro lepší separaci polárních látek je vhodnější použít částice s pevným jádrem a povrchově pórovitou aktivní vrstvou, jež snižuje difúzní dráhy uvnitř částice [51-52]. Silikagel lze modifikovat navázáním různých funkčních skupin (obr. 15), což má za následek zlepšení retence a separace různých druhů analytů [51]. Polární vázané fáze se připravují reakcí silikagelu s trialkoxysilany, které obsahují polární a alkylové skupiny. Středně polární stacionární fáze jsou např. kyanopropyl, diol, aminopropyl, cyklodextrin, alkyly s vázanými amidy či karbamáty nebo polyethylenglykol. Navázané fáze tvoří více či méně polymerní síť, do níž se naváže voda. Obecně se zvyšuje retence analytů v přítomnosti funkčních skupin následovně kyanopropyl < diol < aminopropyl << stacionární fáze s oxidem křemičitým, ale specifické interakce mohou silně ovlivnit selektivitu separace [52-53].



Obrázek 15: Příklady struktury stacionárních fází pro HILIC chromatografii, převzato a upraveno [52]

Nejstarším typem aminové stacionární fáze je aminopropylsilikagel s primární aminovou skupinou. Tento typ stacionární fáze vykazuje zvýšenou afinitu pro kyselé látky a značnou reaktivitu například s aldehydy. Využívá se při analýze cukrů, aminokyselin, peptidů, karboxylových kyselin, nukleosidů a některých farmaceutických látek. Amidové stacionární fáze vykazují lepší stabilitu než aminové. Největší uplatnění nachází při separaci peptidů, dále je možné analyzovat oligosacharidy, glykoproteiny nebo glykosidy. Diolové stacionární fáze jsou vysoce polární a schopné vázat vodík. Uplatňují se při separaci proteinů nebo nízkomolekulárních fenolických sloučenin. Stacionární fáze s navázaným cyklodextrinem se využívá k analýze např. cukerných alkoholů nebo monosacharidů. Cyklodextrin je cyklický oligosacharid obsahující 6-8 glukózových zbytků spojených do prstence [52].

Další skupinou stacionárních fází pro HILIC jsou iontově výměnné a zwitteriontové. Iontově výměnné (kationt/aniontové) stacionární fáze se využívají k analýze a purifikaci dipeptidů a dalších látek jak biologického, tak syntetického původu [49]. Pro současnou separaci aniontů a kationtů se používá zwitteriontová stacionární fáze, která obsahuje jak pozitivně, tak negativně nabitě skupiny [54]. Dále lze modifikovat stacionární fázi pomocí makromolekul nebo polárních organických polymerních materiálů [44,49].

Při HILIC chromatografii je mobilní fáze polární organické rozpouštědlo, jež je mísitelné s vodou. Typickou mobilní fází je směs acetonitrilu a vody. Jako další rozpouštědla lze využít např. tetrahydrofuran, dioxan nebo alkoholy. Do mobilní fáze je také možné přidat iontové aditivum, které slouží jednak pro kontrolu pH a iontové síly, ale také ovlivňuje polaritu analytu. Nejčastěji se využívá octan nebo mravenčan amonný. Analýzy je možné provádět jak



v isokratickém, tak gradientovém módu. V případě gradientové eluce je na začátku vysoký podíl organického rozpouštědla a na konci vysoká koncentrace vody [55].

## 2.6. Vybrané možnosti stanovení umělých sladidel v potravinách pomocí separačních technik

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejvíce používaných technik při analýze umělých sladidel. K detekci US lze využít celou řadu detektorů, např. UV/VIS (či detektor diodového pole), refraktometrický, vodivostní, ELSD nebo hmotnostní spektrometr (MS). V případě analýzy cyklamátu a sukralózy pomocí UV/VIS detektoru je potřeba provést derivatizace. K derivatizaci sukralózy využíváme činidlo *p*-nitrobenzoylchlorid a u cyklamátu např. diazomethan nebo chlór [38].

Ve spojení HPLC-MS *Zygler a kol. (2011)* simultánně analyzovali devět intenzivních sladidel – acesulfam K (ACE-K), aspartam (ASP), alitam (ALI), cyklamát (CYK), dulcin (DUL), neohesperidin dihydrochalkon (NHDC), neotam (NEO), sacharin (SACH) a sukralózu (SU) v různých potravinách (nápoje, jogurty, rybí výrobky). K extrakci sladidel z potravin využili směs kyseliny mravenčí a *N,N*-diisopropylethylaminu, extrakt následně přečistili na SPE kolonce. K analýze byla použita kolona se stacionární fází C<sub>18</sub> (Nucleodur) a mobilní fáze se skládala z acetonu, mravenčanu amonného a methanolu. K ionizaci byl použit elektrosprej a ionty byly zaznamenávány v negativním módu. Využití hmotnostní spektrometrie umožňuje vysoce citlivé a selektivní stanovení US [56]. Ke stanovení ACE-K, SACH, ASP, ALI, NHDC a NEO lze využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detektorem diodového pole. Absorpční maxima látek se pohybují od 195 do 226 nm. Touto metodou byly analyzovány US např. v nápojích, džemech, bonbónech a farmaceutických výrobcích. Limit detekce se pohybuje v rozmezí 0,9 – 0,13 mg/l podle typu umělého sladidla [57]. Metodou HPLC-ELSD je možné analyzovat simultánně stejná sladidla jako je analyzoval *Zygler a kol. (2011)*. Separace probíhá na reverzní fází s gradientovou elucí, přičemž se mobilní fáze skládá z methanolu, acetonu a pufru (směs kyseliny mravenčí a triethylaminu). Uplatňuje se při kvantifikaci US v jogurtech, energetických nápojích a konzervovaném ovoci [58].

Další techniku, kterou použili *Gui a kol. (2016)* ke stanovení ACE-K, CYK, SU, SACH, je iontová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. K separaci analytů využili kolonu Dionex IONPAC AS19 a jako eluční činidlo hydroxid sodný. Látky byly zaznamenávány v negativním módu a k purifikaci vzorků byla zvolena metoda SPE. Metoda je použitelná pro analýzu US ve vodných matricích [59].

Vysokoúčinnou tenkovrstvou kapalinovou chromatografií s denzitometrickou detekcí je možné stanovit ACE-K, NHDC, ASP a SACH. Separace probíhá na destičkách potažených silikagelem F254 a jako mobilní fáze se využívá směs acetonitrilu, vody, ethylacetátu a 10 % vodného roztoku amoniaku. Chromatogram se vyvíjí vzestupně a látky se detekují při různých vlnových délkách. Metoda je aplikovatelná na různé potraviny (bonbóny) a doba analýzy je do 20 minut [60].

Kapilární zónovou elektroforézou s dodatečným hydrodynamickým tokem elektrolytu *Stojkovic a kol. (2013)* stanovili současně CYK, ASP, ACE-K, SACH v nealkoholických nápojích a stolních sladidlech. K analýze využili kapiláru o efektivní délce 32,5 cm a vnitřním průměru 10  $\mu\text{m}$  s elektrolytem složeným z 150 mm kyseliny 2-(cyklohexylamino) ethansulfonové s 400 mm tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris) (pH 9,1), separační napětí bylo 25 kV. Při správné optimalizaci podmínek se jedná o efektivní metodu s dobou analýzy do 3 minut [61].

Další elektromigrační metodou je izotachoforéza, kterou lze stanovit ACE-K, SACH, ASP a CYK v žvýkačkách nebo bonbónech. K separaci použili *Herrmannová a kol. (2006)* kapiláru (fluorovaný ethylenpropyl) o funkční délce 90 mm a vnitřním průměru 0,8 mm, k detekci využili vodivostní detektor. Vedoucí elektrolyt se skládal z 10 mmol/l HCl a 14 mmol/l Tris (pH=7,7) a koncový z 5 mmol/l Tris a L-histidinu (pH=8,3). Jedná se o spolehlivou a jednoduchou metodu s dobou analýzy kolem 20 minut [62].

Pomocí micelární kinetické chromatografie můžeme současně analyzovat několik potravinářských aditiv najednou, včetně ACE-K, SACH a ASP. Metoda je aplikovatelná na vzorky nealkoholických nápojů a džemů. K separaci se využívá kapilára z taveného křemene o efektivní délce 52 cm a vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$ . Látky se detekují při vlnové délce 214 nm a micelární systém se skládá z 20 mmol/l borátové pufru, 35 mmol/l cholátu sodného, 15 mmol/l dodecylsulfátu sodného a 10 % methanolu (pH=9,3) [63]. Podobná aditiva a ACE-K, SACH a ASP stanovovali *Frazier a kol. (2000)* také v nápojích. K detekci využili detektor diodového pole a micelární systém, který se skládal z 20 mmol/l uhličitanového pufru (pH=9,5) a 62 mmol/l dodecylsulfátu sodného [64].

Další separační metodou je plynová chromatografie, jež není příliš využívána. Důvodem je nízká těkavost látek, a proto je nutná derivatizace US, která je časově náročná a může být zdrojem chyb [42]. Jedna z mála publikací o stanovení US pomocí plynové chromatografie je od *Hashemi a kol. (2011)*, již stanovovali cyklamát sodný v nealkoholických nápojích a stolních

sladidlech. Cyklamát derivatizovali pomocí dusitanu sodného a kyseliny sírové. K extrakci derivátu využili headspace mikroextrakci jednou kapkou. Chromatografický systém se skládal z tavené křemenné kapilární kolony, plamenově ionizačního detektoru a nosným plynem byl dusík. Autoři tvrdí, že se jedná o levnou, jednoduchou, přesnou a rychlou metodu bez nežádoucích jevů [65].

### **3. Experimentální část**

#### **3.1. Chemikálie**

Acenaften (99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril CHROMASOLV™ LC-MS (≥ 99 %, Honeywell, USA)

Deionizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Německo)

Homologická řada alkylbenzenů (Benzen, Toluen, Ethylbenzen, Propylbenzen, Butylbenzen, Pentylbenzen; ≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenuhlíčitán amonný (99,5 - 101 %, Honeywell, USA)

Kyselina mravenčí (98–100 %, Merck, Německo)

Kyselina octová (≥ 99 %, Sigma-Aldrich, USA)

Metanol CHROMASOLV™ LC-MS (≥ 99 %, Honeywell, USA)

Mravenčan amonný (≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

Octan amonný (≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

##### **3.1.1. Standardy sladidel**

Acesulfam draselný (≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Advantam (≥ 97,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

Aspartam (≥ 98,0 %, TCI, Japonsko)

N-cyklohexylsulfamát sodný (≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

Neotam (≥ 98,0 %, Sigma-Aldrich, USA)

Sacharin (≥ 98 %, Sigma-Aldrich, USA)

Sukralosa (≥ 98,0 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### **3.2. Přístrojové vybavení**

Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)

Mikropipety (Thermo Scientific, Finsko)

Alpha 10 plus isokratické čerpadlo mobilní fáze (Ecom, Česká republika)

### 3.2.1. Kapalinový chromatograf s ELSD detekcí

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series HPLC Value System (Agilent Technologies, USA) vybavený:

- Degaserem G1379A (Agilent Technologies)
- Binárním čerpadlem G1376A (Agilent Technologies)
- Autosamplerem G1389A (Agilent Technologies)
- Termostatem G1316A (Agilent Technologies)
- DAD detektorem G1315B (Agilent Technologies)
- Detektorem SEDEX 75 (Sedere, Francie)

### 3.2.2. Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem

Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA), který se skládal z:

- Autosampleru s integrovaným termostatem kolon G7129C (Agilent Technologies, USA)
- Kvartérního čerpadla s vestavěným vakuovým degaserem G7104C (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostního detektoru InfinityLab LC/MSD iQ G6160A (Agilent Technologies, USA)

### 3.2.3. Kolony

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (2,1 × 150 mm, velikost částic 2,7 μm, Agilent Technologies, USA)

YMC-Triart, Diol-HILIC (2,0 × 150 mm, velikost částic 5 μm, YMC, Japonsko)

Ascentis® Express, HILIC (2,1 × 100 mm, velikost částic 2,7 μm, Supelco, USA)

Luna® HILIC 200 Å, HILIC (3 × 150 mm, velikost částic 3 μm, Phenomenex, USA)

Luna® Omega SUGAR 100 Å (3 × 150 mm, velikost částic 3 μm, Phenomenex, USA)

Kinetex® Polar C<sub>18</sub> 100 Å (3 × 100 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, USA)

### 3.3. Pracovní postup

#### 3.3.1. Příprava roztoku standardů

Zásobní roztoky standardů byly připraveny navážením 1 mg každého standardu (kap. 3.1.1.) do skleněné vialky. Poté byl přidán 1 ml demineralizované vody, výsledná koncentrace standardů byla 1 mg/ml. Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno 100  $\mu$ l a naředěno demineralizovanou vodou na potřebnou koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Dále byly připraveny standardy směsi umělých sladidel. První směs umělých sladidel měla koncentraci 100  $\mu$ g/ml a druhá 10  $\mu$ g/ml.

#### 3.3.2. Příprava mobilních fází

Mobilní fáze byly připraveny podle tabulky 6 do 250 ml zásobních lahví. Koncentrace octanu amonného byla v každé mobilní fázi 10 mmol/l.

Tabulka 6: Složení mobilních fází

Mobilní fáze	Acetonitril (% , v/v)	Methanol (% , v/v)	Roztok pufru (% , v/v)
1	56	14	30
2	63	7	30
3	70	0	30
4	67	17	16
5	76	8	16
6	84	0	16
7	78	20	2
8	88	10	2
9	96	0	4

Složení mobilních fází bylo navrženo pomocí programu Statistika (tab. 7). Při vyjadřování závislosti mezi organickou a vodnou složkou mobilní fáze se vycházelo ze studie *Kawabe T. a kol.* (2013) [66]. Celkový obsah organického rozpouštědla ( $\varphi_T$ ) zobrazuje rovnice (1) a rozsah hodnot byl zvolen od 0,7 do 0,98 včetně. Rovnice (2) definuje zlomek acetonitrilu v celkovém organickém rozpouštědel ( $\varphi_{A/M}$ ) v rozsahu zvolených hodnot od 0,80 do 1 včetně.

$$\varphi_T = \varphi_{ACN} + \varphi_{MeOH} \quad (1)$$

$\varphi_{MeOH}$  – podíl methanolu

$\varphi_{ACN}$  – podíl acetonitrilu

$$\varphi_{A/M} = \frac{\varphi_{ACN}}{\varphi_{ACN} + \varphi_{MeOH}} \quad (2)$$

Tabulka 7: Statistická data pro výpočet složení mobilních fází

Mobilní fáze	$\varphi_T$	$\varphi_{A/M}$
2	0,7	0,9
7	0,98	0,8
1	0,7	0,8
4	0,84	0,8
8	0,98	0,9
3	0,7	1
5	0,84	0,9
9	0,98	1
6	0,84	1

Vynásobením  $\varphi_T$  a  $\varphi_{A/M}$  byla získána koncentrace acetonitrilu. Odečtením vypočtené hodnoty acetonitrilu od celkové koncentrace organického rozpouštědla byla získána koncentrace methanolu. Podíl pufru byl vypočítán odečtením součtu koncentrace methanolu a acetonitrilu od hodnoty jedna. Výsledky bylo ještě nutné vynásobit hodnotou sto, aby výsledky byly v procentech.

### 3.3.3. Podmínky analýzy mimokolonových příspěvků

Mimokolonové příspěvky byly měřeny na koloně Kinetex Polar C<sub>18</sub> v režimu izokratické eluce s DAD detektorem při vlnové délce 254 nm. Mobilní fáze obsahovala směs acetonitrilu (80 %, v/v) a vody (20 %, v/v). Dávkovaný objem látek byl 1  $\mu$ l a teplota na koloně 30 °C.

### 3.3.4. Podmínky analýzy mrtvých časů kolon a jejich pórovitosti

Dávkován byl 1  $\mu$ l, průtok mobilní fáze činil 300  $\mu$ l/min nebo 200  $\mu$ l/min podle typu kolony. Teplota kolony byla 30 °C a acenaften se detekoval DAD detektorem při vlnové délce 254 nm. Mrtvé časy se měřily v režimu izokratické eluce při třech různých koncentracích acetonitrilu ve vodě (50 ,75 a 90 %, v/v).

### 3.3.5. Nastavení hmotnostního spektrometru

Podmínky MS detekce byly následující: ionizace elektrosprejem, záznam v režimu selektivního monitorování vybraných iontů, negativní a pozitivní polarita. Nastavení MS: teplota dusíku 325 °C, nebulizer 40 psi, průtok dusíku 10 l/min.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Analýza mimokolonových příspěvků pomocí kapalinové chromatografie s detektorem rozptylu světla a s detektorem diodového pole

#### 4.1.1. Mimokolonové příspěvky

Jako první se u kapalinové chromatografu s ELSD a DAD detekcí byly zjišťovány vlivy, jež způsobují rozšiřování chromatografických zón. Nermalou měrou mohou k rozšiřování přispívat i mimokolonové příspěvky. Ty představují rozšíření chromatografických píků v nástřikovém zařízení, spojovacích zařízeních a detektoru. Podobně jako při náhodném rozložení chyb, kde se sčítají rozptyly (čtverce odhadů směrodatných odchylek) jednotlivých nekorelovaných zdrojů chyb, lze charakterizovat i směrodatnou odchylku chromatografického píku pomocí známých příspěvků kolony,  $\sigma^2_{\text{kolona}}$ , a mimokolonových příspěvků jednotlivých součástí systému k rozšiřování píků,  $\sigma^2_{\text{dávkování}}$ ,  $\sigma^2_{\text{spoje}}$ ,  $\sigma^2_{\text{detekce}}$ , které přispívají k celkovému rozptylu zón analyzovaných látek,  $\sigma^2_{\text{celkový}}$ , podle rovnice (3):

$$\sigma^2_{\text{celkový}} = \sigma^2_{\text{kolona}} + \sigma^2_{\text{dávkování}} + \sigma^2_{\text{spoje}} + \sigma^2_{\text{detekce}} \quad (3)$$

Rozptyl analyzované zóny v časových jednotkách dosahovaných na koloně souvisí s účinností separace  $N$  podle rovnice (4).

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma_{t,\text{kolona}}^2} \quad (4)$$

$t_r$  – retenční čas analyzované látky (nejčastěji série homologů alkybenzenové řady)

Při zapojení kolony v chromatografickém systému lze mimokolonový objem získat ze závislosti experimentálně určených rozptylů píků vhodné směsi analytů na druhé mocnině jejich retenčních časů nebo objemů. Extrapolací této závislosti (rovnice 5,6) na nulový retenční čas bylo získáno  $\sigma_t^2$  a s použitím objemového průtoku mobilní fáze pak  $\sigma_v^2$  a po odmocnění byl získán přibližný mimokolonový objem. Rozptyly píků lze při uvažování Gaussovského profilu píku nahradit šířkou v polovině jeho výšky.

Výpočet pro rozptyl píků:

$$\sigma_{\text{celkový}}^2 = \frac{w_{0,5}^2 \times F_m^2}{(2\sqrt{2\ln 2})^2} \quad (5)$$

$w_{0,5}$  – šířka píku v polovině jeho výšky

$F_m$  – průtok mobilní fáze



Výpočet pro druhou mocninu retenčního objemu látky:

$$V_r^2 = (F_m \times t_r)^2 \quad (6)$$

$t_r$  – retenční čas látek

K určení rozptylu píků byla využita homologická řada alkylbenzenů o koncentraci 20 mg/l, přesný výčet látek a všechna naměřená data jsou uvedena v příloze (tabulka P1-P3). Mimokolonové příspěvky byly měřeny při třech průtocích mobilní fáze a výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Mimokolonové příspěvky při různých průtocích mobilní fáze

Průtok	$\sigma^2$ mimokol. ( $\mu\text{l}$ )
300 $\mu\text{l}/\text{min}$	4,96
200 $\mu\text{l}/\text{min}$	3,87
100 $\mu\text{l}/\text{min}$	7,62

#### 4.1.2. Mrtvé časy kolon a pórovitost kolon

Acenaften o koncentraci 100 mg/l byl zvolen jako standard pro naměření mrtvých časů na kolonách InfinityLab Poroshell, YMC-Triart Diol, Ascentis Express, Luna Hilic a Luna Omega Sugar. Mrtvé časy se měřily v režimu izokratické eluce při třech různých koncentracích acetonitrilu ve vodě (50, 75 a 90 %, v/v). Z naměřených dat byl vypočítán mrtvý objem (rovnice 7) a dále i celková pórovitost kolony podle rovnic (8) a (9). Vypočtená pórovitost, mrtvé objemy a časy kolon jsou uvedeny v tabulce P4-P8.

$$V_m = F_m \times t_m \quad (7)$$

$F_m$  – průtok mobilní fáze

$t_m$  – mrtvý čas

$$V_g = \frac{\pi \times d^2}{4} \times l \quad (8)$$

$d$  – průměr kolony

$l$  – délka kolony

$$\varepsilon_T = \frac{V_m}{V_g} \quad (9)$$

Vypočtené hodnoty pórovitostí korespondují s použitým typem stacionární fáze v koloně, kdy pro jedinou kolonu s plně porézními částicemi Luna Hilic byla určena průměrná pórovitost větší než 0,75. U ostatních kolon byly pórovitosti nižší; u kolon Luna Omega Sugar a InfinitiLab Poroshell byla pórovitost pod 0,70 a byla ze všech použitých kolon nejnižší.

#### **4.1.3. Retenční chování umělých sladidel v chromatografii hydrofilních interakcí s ternárními mobilními fázemi**

Na vybraných kolonách (kap. 4.1.2.) byly měřeny retenční časy všech sedmi standardů (kap. 3.1.1). Retenční časy byly měřeny při izokratické eluci s devíti mobilními fázemi (kap. 3.3.2). K analýze byl vybrán kapalinový chromatograf s ELSD detekcí (Agilent 1100 Series), kde teplota zmlžovače byla nastavena na 50 °C, zesílení mělo hodnotu 12 a tlak dusíku 2,5 bar (250 kPa). Na všech kolonách byla udržována teplota 30 °C a dávkován byl 1 µl standardu. Průtok mobilní fáze se lišil podle typu kolon viz tabulka P4-P8. Jako první byla měřena kolona Luna Hilic a YMC-Triart Diol, na které se naměřila všechna retenční data standardů bez problémů kromě aspartamu. Ten při mobilních fázích, které obsahovaly větší podíl acetonitrilu, eluoval jako široký rozmytý pík. Ze vzniklého píku nešel odečíst retenční čas. Následovala kolona Luna Omega Sugar, u které bylo možno naměřit retenční časy jen tehdy, pokud mobilní fáze obsahovala vysoký podíl acetonitrilu (mobilní fáze 9,8,7, tabulka 6) a malý podíl vody. Důvodů mohlo být několik, např. špatné zmlžování mobilní fáze při vysokém podílu vody nebo špatně zvolený pufr. V první řadě byla testována úprava podmínek na detektoru. Bohužel, ani při vyšší teplotě zamlžujícího plynu (65 °C), nebo při úpravě tlaku se látky nepodařilo detekovat. Dalším pokusem bylo připojení isokratického čerpadla mobilní fáze, pomocí kterého byl za kolonou přimícháván k eluátu čistý acetonitril (kap. 3.2.). Čerpadlo bylo připojeno na výstup z kolony a mělo pomoci k lepšímu zmlžování mobilní fáze. Připojení čerpadla pomohlo pouze v případě, kdy mobilní fáze obsahovala do 16 % (v/v) vodného roztoku pufru. V poslední řadě byla testována výměna octanu amonného za jiná těkavá aditiva, jež jsou shrnuta v tabulce 9. Bohužel, i při použití těchto aditiv nebylo dosaženo lepšího výsledku detekce, a proto byly retenční charakteristiky US dále měřeny na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

Tabulka 9: Přehled vyzkoušených těkavých aditiv

Těkavá aditiva	Koncentrace
Hydrogenuhličitan amonný	10 mmol/l
Mravenčan amonný	10 mmol/l
Kyselina octová	0,2 % (v/v)
Kyselina mravenčí	0,2 % (v/v)

Na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II (kap. 3.2.2.) s hmotnostní detekcí byly přeměřeny všechny retenční časy, které byly naměřeny na kapalinovém chromatografu s ELSD detekcí (kolony Luna Hilic a YMC-Triart Diol). Následně pak byly doměřeny také retenční časy na zbývajících kolonách (kap. 4.1.2). Dávkování standardu, teploty na kolonách, průtoky a druhy mobilních fází byly stejné jako na kapalinovém chromatografu s ELSD detekcí. Jednotlivé ionty US byly detekovány pomocí režimu SIM (Selektivní monitorování iontů) podle hodnot m/z uvedených v tabulce 10.

Tabulka 10: Hodnoty selektivního monitorování iontů

Látka	Polarita	Q1 Mass (m/z)
Acesulfam draselný	-	162
N-cyklohexylsulfamát sodný	-	178
Sacharin	-	182
Aspartam	+	295
Sukralóza	-	397
Neotam	+	379
Advantam	+	459

Z naměřených průměrných retenčních časů byl vypočítán retenční faktor (rovnice 10), který se poté logaritmoval, a výsledky byly zpracovány v programu Statistika. Všechna retenční data jsou uvedena v příloze (tabulka P9-P13). Retenční časy chybí u aspartamu na koloně Luna Omega Sugar (mobilní fáze 8 a 9, tabulka 6) a koloně Ascentis Express (mobilní fáze 9, tabulka 6) z důvodu jeho velké retence v kolonách.

$$k = \frac{t_{ri} - t_m}{t_m} \quad (10)$$

#### 4.1.4. Vyhodnocení dat

Závislost logaritmů retenčních faktorů (kap. 4.1.3) na změnách koncentrace methanolu v mobilních fázích byly vyhodnocovány v programu Statistika. Aby bylo možné správně vyhodnotit experiment, bylo nutné dosazovat mobilní fáze ve tvaru, jaký je uveden v tabulce 7.

Pokud retenční faktor vyšel v záporných hodnotách (látka eluovala před mrtvým objemem), nebyl k vyhodnocení použit. Data byla analyzována pomocí funkce nelineárních odhadů programu Statistika a to tak, že byly proloženy logaritmy retenčních faktorů jednotlivých látek na každé koloně v závislosti na celkovém objemovém zlomku organického rozpouštědla v mobilní fázi,  $\varphi_T$ , a objemovém zlomku acetonitrilu v organické části mobilní fáze,  $\varphi_{A/M}$ . K popsání závislostí byl uvažován empirický model ve formě polynomu druhého stupně s lineární interakcí mezi členy  $\varphi_T$  a  $\varphi_{A/M}$ , podle rovnice (11):

$$\log k = p_0 + p_1 \cdot \varphi_T + p_2 \cdot \varphi_T^2 + p_3 \cdot \varphi_{A/M} + p_4 \cdot \varphi_{A/M}^2 + p_5 \cdot \varphi_T \cdot \varphi_{A/M} \quad (11)$$

Parametry rovnice (11) stanovené nelineární regresí jsou umístěny pro jednotlivé kolony v tabulkách P14-P18. Na kolonách Luna Hilic a Ascentis Express chybí parametry u acesulfamu draselného, jelikož k vyhodnocení nebylo dostatek dat (látka eluovala před mrtvým objemem). Pro látky, které eluovaly při některých použitých mobilních fázích před mrtvým objemem kolony, nebo byla retence ve všech mobilních fázích nízká, byly všechny, nebo většina regresních koeficientů rovnice (11) statisticky nevýznamné. Na základě stanovených regresních koeficientů je pro většinu látek s dostatečnou retencí statisticky významný koeficient  $p_1$  a  $p_2$ , charakterizující vliv celkového obsahu organického rozpouštědla v mobilní fázi a dále koeficient  $p_5$  charakterizující interakci mezi celkovým obsahem organického rozpouštědla a zastoupením acetonitrilu/methanolu. Záporné hodnoty koeficientů  $p_1$ , a naopak kladné u  $p_2$  indikují konvexní tvar retenční plochy popsané rovnicí (11). Přestože byly koeficienty  $p_3$  a  $p_4$  pro většinu látek stanoveny jako statisticky nevýznamné a retenci v ternárních mobilních fázích by tedy neměla ovlivňovat volba typu organického rozpouštědla (acetonitril nebo methanol), typ rozpouštědla se projevuje v interakčním koeficientu  $p_5$ . Kladná hodnota interakčního koeficientu  $p_5$  pro většinu látek ukazuje na vyšší eluční sílu methanolu v porovnání s acetonitrilem, kdy při snižování hodnoty  $\varphi_{A/M}$  dochází k významnému poklesu  $\log k$ .

V příloze P19-P23 je jako příklad uvedeno grafické znázornění parametrů advantamu na všech pěti kolonách. Grafické závislosti potvrzují jednak vliv zvýšení retence advantamu při zvyšování celkového obsahu organických rozpouštědel  $\varphi_T$  (HILIC retenční mechanismus) a zároveň také interakci acetonitrilu/methanolu v mobilní fázi, kdy zejména u mobilních fází s vysokým  $\varphi_T$  dochází k výraznému poklesu  $\log k$  při změně  $\varphi_{A/M}$ . Vlivy složení mobilní fáze a zastoupení acetonitrilu a methanolu byly dále ověřovány také pro gradientovou eluci.

#### 4.1.5. Analýza směsi standardů pomocí gradientové eluce

Na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II (kap. 3.2.2.) s hmotnostní detekcí byly na vybraných kolonách (YMC-Triart Diol, Luna Omega Sugar, InfinityLab Poroshell) testovány analýzy standardní směs sladidel s gradientovou elucí. Pro gradientovou eluci byly zvoleny kolony, na kterých byly naměřeny nejvyšší retenční faktory při izokratických analýzách a zároveň na nich nedocházelo k eluci před mrtvým objemem. Podmínky na kapalinovém chromatografu byly stejné jako v kap. 4.1.3. Analýzy probíhaly v režimu gradientové eluce a vybrané profily gradientů jsou uvedeny v tabulce 11-13. Jako první byla použita směs standardů o koncentraci 100 µg/ml, ale pro lepší tvar píky byly dále analyzovány směsi s koncentracemi 10 µg/ml umělých sladidel. Nakonec byl snížen i objem dávkování vzorku na 0,5 µl, protože díky použití gradientové eluce byly píky užší a odezva byla dostatečná i při tomto dávkovaném množství.

Tabulka 11: Gradient číslo 1

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)	$\varphi_T$	$\varphi_{A/M}$
0	1	99	0	0,99	1
15	50	50	0	0,5	1
16	1	99	0	0,99	1
Post-time		15 min			

Tabulka 12: Gradient číslo 2

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)	$\varphi_T$	$\varphi_{A/M}$
0	1	99	0	0,99	1
15	50	0	50	0,5	0
16	1	99	0	0,99	1
Post-time		15 min			

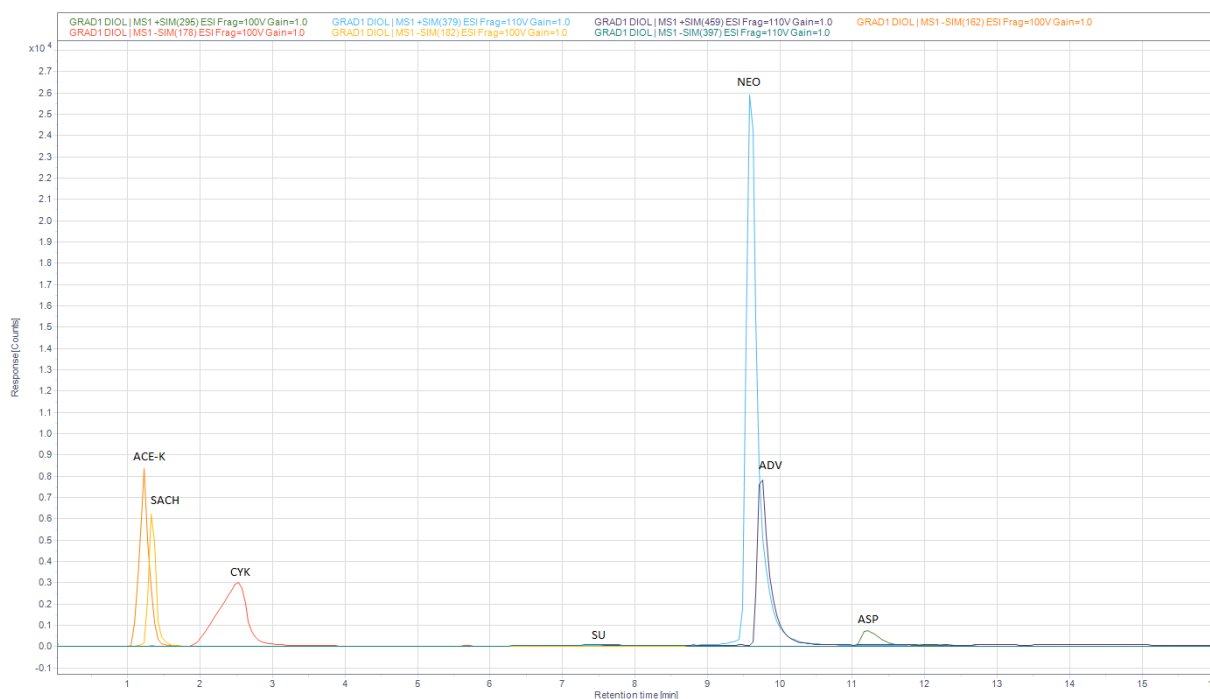
Tabulka 13: Gradient číslo 3

Čas (min)	Roztok pufru (%, v/v)	Acetonitril (%, v/v)	Methanol (%, v/v)	$\varphi_T$	$\varphi_{A/M}$
0	1	99	0	0,99	1
15	50	25	25	0,5	0,5
16	1	99	0	0,99	1
Post-time		15 min			

Použité profily gradientů, popsané v tabulkách 11-13, byly navrženy tak, aby postihly stejnou celkovou změnu obsahu organických rozpouštědel  $\varphi_T$  při použití samotného acetonitrilu ( $\varphi_{A/M}$  je konstantní a roven jedné; gradient číslo 1), při celkové výměně acetonitrilu za methanol v průběhu gradientu ( $\varphi_{A/M}$  klesá od 1 do 0; gradient číslo 2) a při výměně polovičního množství acetonitrilu za methanol ( $\varphi_{A/M}$  klesá od 1 do 0,5; gradient číslo 3).

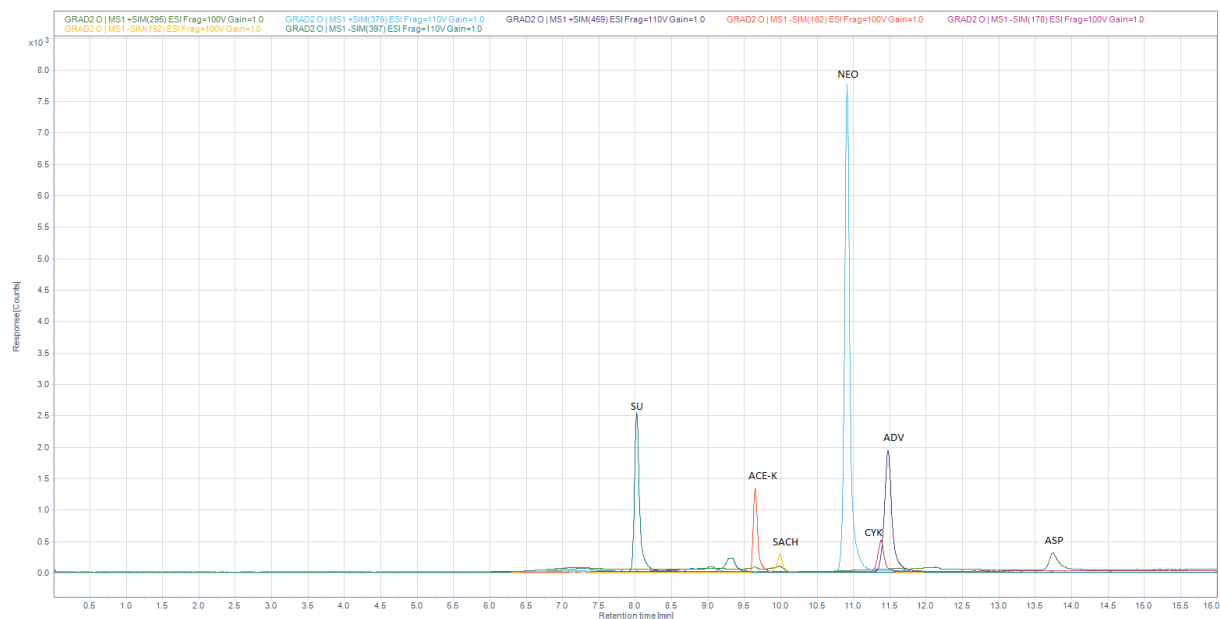
K nejhorší analýze standardů umělých sladidel došlo na koloně YMC-Triart Diol. Při analýze nedošlo k dobrému rozlišení acesulfamu draselného a sacharinu ani při jednom použitém gradientu. Navíc sukralóza eluovala jako velký široký rozmytý pík. Na obrázku 16 je uveden chromatogram při použití prvního gradientu.

Obrázek 16: Gradient č.1 na koloně YMC-Triart Diol



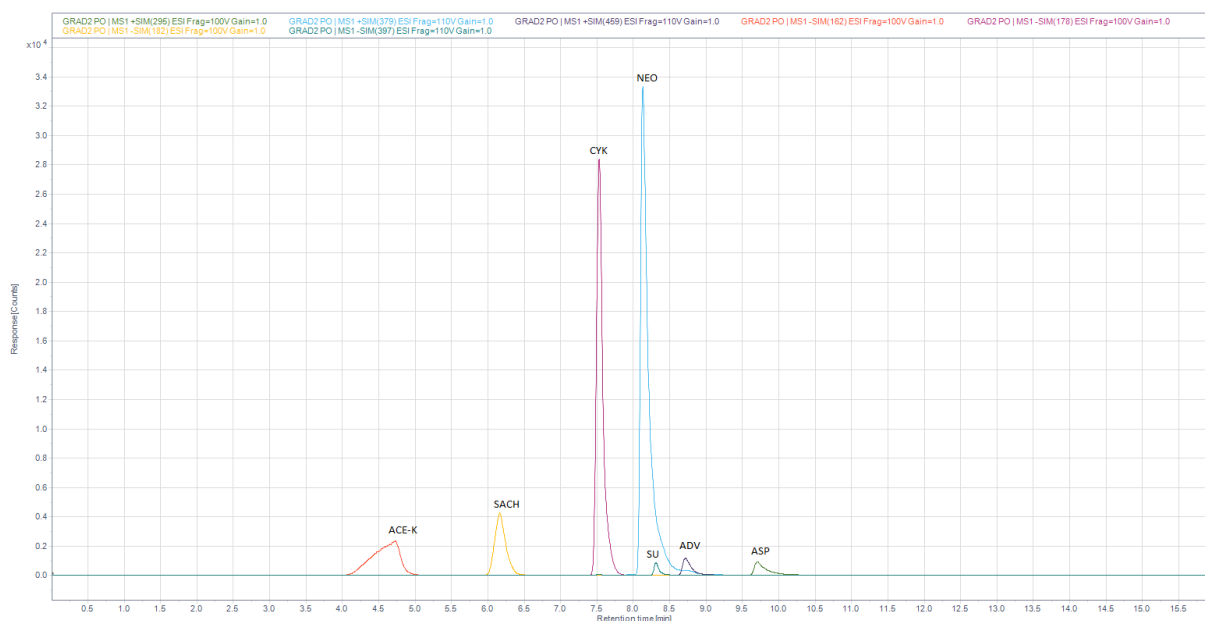
Na koloně Luna Omega Sugar došlo k rozdělení všech látek při použití všech tří gradientů. Nicméně pík aspartamu byl rozmytý. Pokud bychom porovnali gradienty mezi sebou, nejnižší retenční časy látek byly při použití druhého gradientu, tedy pokud se zvyšovala koncentrace methanolu (obr. 17). U ostatních gradientů nebyly retenční časy příliš odlišné. Uvedené výsledky korespondují s interpretací izokratického retenčního modelu, kdy methanol vykazoval v porovnání s acetonitrilem vyšší eluční sílu.

Obrázek 17: Gradient č.2 na koloně Luna Omega Sugar



Na koloně InfinityLab Poroshell bylo zaznamenáno nejlepší rozlišení všech sedmi standardů u všech použitých gradientů. U všech látek kromě acesulfamu draselného došlo ke snížení retenčních časů při použití druhého gradientu (obr.18). Nejdelší retenční časy byly zaznamenány u gradientu, kde sem měnil podíl pufru a acetonitrilu (gradient 1).

Obrázek 18: Gradient č.2 na koloně InfinityLab Poroshell



Ostatní chromatogramy jsou uvedeny v přílohách P24-P29 Průměrné retenční časy látek na všech použitých kolonách jsem shrnuty v tabulkách P30-P32. Kromě retenčních časů jsou v tabulkách vypočteny (rovnice 12 a 13) hodnoty  $\varphi_{A/M,e}$  a  $\varphi_{T,e}$ , které představují podíly celkového organického rozpouštědla ( $\varphi_{T,e}$ ) a podíl acetonitrilu/methanolu ( $\varphi_{A/M,e}$ ) při retenčním času dané látky v průběhu gradientu (složení mobilní fáze v bodě eluce). Podíl  $\varphi_{A/M,e}$  byl vypočítán pouze v případě, kdy se v gradientu měnila hodnota  $\varphi_{A/M}$ , tedy pouze pro gradient číslo 2 a 3 (tabulka 12-13). Dále je v tabulkách uveden retenční faktor  $k_e$  vypočítaný podle rovnice (10), tzn. retenční faktor v gradientu v bodě eluce. Hodnota zpoždění gradientu použitá při výpočtech byla převzata ze studie *Vanova J. a kol. (2022)*, při které se také využíval stejný kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (kap. 3.2.2.) s hmotnostní detekcí [67].

$$\varphi_{T,e} = \varphi_{T,0} - \frac{\Delta\varphi_T}{\Delta t_g} \cdot (t_r - t_D) \quad (12)$$

$$\varphi_{A/M,e} = \varphi_{A/M,0} - \frac{\Delta\varphi_{A/M}}{\Delta t_g} \cdot (t_r - t_D) \quad (13)$$

Z porovnání všech vypočtených parametrů, tj. složení mobilní fáze v bodě eluce a retenční faktor v bodě eluce, je patrné, že použití methanolu v kombinaci s acetonitrem v ternární mobilní fázi vede ke snížení retence látek, a tedy ke zvýšení eluční síly mobilní fáze, ovšem v menší míře než při korespondujícím zvýšení obsahu vodného pufru v mobilní fázi. Dále byly vypočítány selektivity separace dvojic látek elujících v gradientu  $\alpha_g$  podle rovnice (14):



$$\alpha_g = k_{e,j}/k_{e,i} \quad (14)$$

Z porovnání hodnot vypočtených selektivit (tabulka P33-P35) je zřejmé, že použití methanolu v kombinaci s acetonitrilem v ternární mobilní fázi vede ke změnám selektivit v závislosti na změně poměru methanolu a acetonitrilu,  $\varphi_{A/M}$ . V případech kolon Luna Omega Sugar (gradient č. 2) a InfinityLab Poroshella (gradient č. 2 a 3) docházelo ke změnám pořadí eluce látek u gradientů. Kombinace acetonitrilu a methanolu, tak může být vhodným způsobem použita k jemnému nastavení selektivity separace v gradientu.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zkoumat vliv ternární mobilní fáze při analýze umělých sladidel pomocí chromatografie hydrofilních interakcí. Ternární mobilní fáze byla složena z octanového pufru, acetonitrilu a methanolu.

V první části experimentu byl zkoumán vliv methanolu na separaci umělých sladidel při izokratické eluci na pěti kolonách. Ze statistického vyhodnocení dat vyplývá, že stěžejní vliv na separaci má celkový podíl organického rozpouštědla, čímž se potvrzuje teorie chromatografie hydrofilních interakcí. S rostoucí koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi se tedy prodlužuje retence látek v koloně, a naopak s rostoucí podílem vodné složky retence klesá. Dále u většiny látek vyšel významný parametr, který zastupoval podíl methanolu/acetonitrilu. Z tohoto lze usuzovat na vliv methanolu na separaci. Tento potencionální vliv byl dále zkoušen pomocí gradientové eluce na směsi standartu umělých sladidel.

Na třech vybraných kolonách byly vyzkoušeny tři gradienty. První z gradientů neobsahoval methanol, další dva jej obsahovaly. Nejkratší retenční časy většiny látek byly naměřeny při použití gradientu, kde klesala koncentrace acetonitrilu ve prospěch methanolu. Celkově k nejlepšímu rozlišení látek došlo na koloně InfinityLab Poroshell. Z výsledků lze usuzovat, že methanol má vliv na zlepšení rozlišení umělých sladidel, zkracuje jejich čas zadržení v koloně a ovlivňuje selektivitu separace při gradientové eluci.

## ZDROJE

- [1] Wilk K., Korytek W., Pelczyńska M., Moszak M., Bogdański P., The Effect of Artificial Sweeteners Use on Sweet Taste Perception and Weight Loss Efficacy: A Review, *Nutrients* (2022), vol. 14, no. 6, 1261.
- [2] Mooradian A.D., Smith M., Tokuda M., The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review, *Clin Nutr ESPEN*. (2017), vol. 18, 1-8.
- [3] Basson A.R., Rodriguez-Palacios A., Cominelli F., Artificial Sweeteners: History and New Concepts on Inflammation, *Front Nutr*. (2021) vol. 8.
- [4] Shankar P., Ahuja S., Sriram K., Non-nutritive sweeteners: review and update, *Nutrition* (2013), vol. 29, no. 11-12, 1293-1299.
- [5] ROUBÍK, Lukáš. Moderní výživa ve fitness a silových sportech. Praha: Erasport, 2018, 208-211, ISBN 978-80-905685-5-6.
- [6] Edwards C.H., Rossi M., Corpe C.P., Butterworth P. J., Ellis P.R., The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future, *Trends in Food Science & Technology* (2016), vol. 56,158-166.
- [7] Msomi N.Z., Erukainure O.L., Islam M.S., Suitability of sugar alcohols as antidiabetic supplements: A review., *J Food Drug Anal*. (2021), vol. 29, no.1, 1-14.
- [8] Carocho M., Morales P., Ferreira ICFR., Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem Toxicol*. (2017), vol. 107 (Pt A), 302-317.
- [9] Baran E. J., Veysel Y.T., Metal complexes of saccharin, *Coordination Chemistry Reviews* (2006), vol. 250, no. 15–16,1980-1999.
- [10] Chattopadhyay S., Raychaudhuri U., Chakraborty R., Artificial sweeteners – a review. *J Food Sci Technol*. (2014), vol. 51, no.4, 611-621.
- [11] Choudhary A.K., Pretorius E., Revisiting the safety of aspartame, *Nutrition Reviews* (2017), vol. 75, no. 9, 718–730.
- [12] Zafar T., Naik Q. A. B., Shrivastava V. K., Aspartame: effects and awareness. *MOJ Toxicol* (2017), vol. 3, no. 2, 23-26.
- [13] Čopíková J., Moravcová J., Wimmer Z., Opletal L., Lapčík O., Drašar P., Náhradní sladidla. *Chemické listy* (2013), vol. 107, no. 11, 867-874 *107*(11), 867-874.
- [14] Marinovich M., Galli C.L., Bosetti C., Gallus S., Vecchia C. L., Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues, *Food and Chemical Toxicology* (2013), vol. 60, 109-115.
- [15] von Rymon Lipinski G. W., The new intense sweetener Acesulfame K, *Food Chemistry* (1985), vol. 16, no. 3-4, 259-269.

- [16] Ager D. J., Pantaleone D. P., Henderson S. A., Katritzky A. R., Prakash, I., Walters, D. E., Commercial, synthetic nonnutritive sweeteners. *Angewandte Chemie International Edition* (1998), vol. 37, no. 13-14, 1802-1817.
- [17] Belton K., Schaefer E., Guiney P. D., Review of the Environmental Fate and Effects of Acesulfame-Potassium. *Integrated environmental assessment and management* (2020), vol. 16, no. 4, 421-437.
- [18] Binns N. M., Sucralose—all sweetness and light. *Nutrition Bulletin* (2003), vol. 28, no.1, 53-58.
- [19] Magnuson B.A., Roberts A., Nestmann E.R., Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food Chem Toxicol* (2017), vol. 106, 324-355.
- [20] Schiffman S.S., Rother K.I., Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* (2013), vol.16, no.7, 399-451.
- [21] Rangan C., Barceloux D. G., Food Additives and Sensitivities, *Disease-a-Month* (2009), vol. 55, no. 5, 292-311.
- [22] Dostupné z: [https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/sugars-sweeteners-7\\_en](https://knowledge4policy.ec.europa.eu/health-promotion-knowledge-gateway/sugars-sweeteners-7_en) [online cit. 2022-10-20].
- [23] Nofre C., Tinti J. M., Neotame: discovery, properties, utility, *Food Chemistry* (2000), vol. 69, no. 3, 245-257.
- [24] Otabe A., Fujieda T., Masuyama T., Ubukata K., Lee C., Advantame – An overview of the toxicity data, *Food and Chemical Toxicology* (2011), vol. 49, no. 1, S2-S7.
- [25] Dostupné z: <https://www.baynsolutions.com/en/advantam-guide-to-artificial-sweeteners/1118651> [online cit. 2022-10-29].
- [26] Scientific Opinion on the safety of advantame for the proposed uses as a food additive, *EFSA Journal* (2013), vol. 11, no.7.
- [27] Dhartiben B. K., Aparnathi, K. D., Chemistry and use of artificial intense sweeteners. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* (2017), vol. 6, no.6, 1283-1296.
- [28] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II.* 3.vydání. Tábor: OSSIS, 2009, 372-378, ISBN 978-80-86659-16-9.
- [29] Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners> [online cit. 2022-11-13].
- [30] Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-253/zneni-20181109#p6-1-3> [online cit. 2022-11-13].
- [31] Suez J., Cohen Y., Valdés-Mas R., Mor U., Dori-Bachash M., Federici S., Zmora N., Leshem A., Heinemann M., Linevsky R., Zur M., Ben-Zeev Brik R., Bukimer A., Eliyahu-Miller S., Metz A., Fischbein R., Sharov O., Malitsky S., Itkin M., Stettner N., Harmelin A., Shapiro H., Stein-Thoeringer C.K., Segal E., Elinav E., Personalized microbiome-driven effects of non-nutritive sweeteners on human glucose tolerance, *Cell*. (2022), vol. 185, no. 18, 3307-3328.e19.

- [32] Suez J., Korem T., Zeevi D., Zilberman-Schapira G., Thaïss C. A., Maza O, Israeli D., Zmora N., Gilad S., Weinberger A., Kuperman Y., Harmelin A., Kolodkin-Gal I., Shapiro H., Halpern Z., Segal E., Elinav E., Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota, *Nature* (2014), vol. 514, no. 7521, 181–186.
- [33] Lobach A. R., Roberts A., Rowland I. R. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota, *Food and Chemical Toxicology* (2019), vol. 124, 385-399.
- [34] Dalenberg J. R., Patel B. P., Denis R., Veldhuizen M. G., Nakamura Y., Vinke P.C., Luquet S., Small D. M., Short-term consumption of sucralose with, but not without, carbohydrate impairs neural and metabolic sensitivity to sugar in humans, *Cell Metabolism* (2020), vol 31, no. 3, 493–502.e7.
- [35] Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065005.html> [online cit. 2022-11-13].
- [36] Awuchi C. G., Echeta K. C., Current developments in sugar alcohols: Chemistry, nutrition, and health concerns of sorbitol, xylitol, glycerol, arabitol, inositol, maltitol, and lactitol, *International Journal of Advanced Academic Research* (2019), vol. 5, no. 11, 1-33.
- [37] Godswill A. C., Sugar alcohols: chemistry, production, health concerns and nutritional importance of mannitol, sorbitol, xylitol, and erythritol, *International Journal of Advanced Academic Research* (2017), vol. 3, no. 2, 31-66.
- [38] Oktavirina V., Prabawati N. B., Fathimah R. N., Palma M., Kurnia K. A., Darmawan N., Yulianto B., Setyaningsih W., Analytical Methods for Determination of Non-Nutritive Sweeteners in Foodstuffs. *Molecules* (2021), vol. 26, no. 11, 3135.
- [39] Kim M. H., Lee D. Y., Ahn J. H., A study on the analysis of artificial sweeteners in processed foods including emulsified foods by HPLC-DAD, *Analytical Science and Technology* (2020), vol. 33, no. 5, 209-214.
- [40] Zygler A., Wasik A., Namieśnik J., Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents, *Talanta* (2010), vol. 82, no.5, 1742-1748.
- [41] Żwir-Ferenc A., Biziuk M., Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications, *Polish Journal of Environmental Studies* (2006), vol 15, no. 5, 677-690.
- [42] Zygler A., Wasik A., Namieśnik J., Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2009), vol 28, no. 9, 1082-1102.
- [43] Nielsen, S.Suzanne (Eds.). Food Analysis. Fifth edition, Springer Cham, 2017, 185-226, ISBN 978-3-319-45776-5.
- [44] Čáslavský, Josef a Ševčík G. K. Jiří. Organická analýza. Český Těšín: 2 THETA, 2022, 119-186, ISBN 978-80-88279-17-4.
- [45] Nollet L.M. Leo, Toldra Fidel (Eds.). Food Analysis by HPLC. 3rd Edition. CRC Press, 2013, 2-18, ISBN 9781439830840.
- [46] Nollet L.M. Leo (Ed.). Food Analysis by HPLC. 2nd Edition. CRC Press, 2000, 1-55, ISBN 978-0824784607.

- [47] Zhang B., Li X., Yan B., Advances in HPLC detection—towards universal detection., *Anal Bioanal Chem* (2008), vol. 390, 299–301.
- [48] Friedecký D., Lemr K., Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klinická biochemie a metabolismus* (2012), roč. 20 (41), č. 3, 152-157.
- [49] Fanali, Salvatore, Haddad, R. Paul, Poole, F. Colin, Riekkola, Marja-Liisa (Eds.). Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation, 2nd Edition. Elsevier, 2017, 147-162, ISBN 978-0-12-805393-5.
- [50] McCalley D.V., Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* (2017), vol. 1523, 49-71.
- [51] Jandera P., Janás P., Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review, *Analytica Chimica Acta* (2017), vol. 967, 12-32.
- [52] Jandera P., Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Analytica Chimica Acta* (2017), vol. 692, no. 1-2, 1-25.
- [53] Guo Y., Gaiki S., Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *Journal of Chromatography A* (2011), vol. 1218, no. 35, 5920-5938.
- [54] Qiu H., Liang X., Sun M., Jiang S., Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Anal Bioanal Chem* (2011), vol. 399, 3307–3322.
- [55] Buszewski B., Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal Bioanal Chem* (2012), vol. 402, 231–247.
- [56] Zygler A., Wasik A., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, *Anal Bioanal Chem.* (2011), vol. 400, no. 7, 2159-2172.
- [57] Sezgin B., Arli G., Can N. Ö., (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* (2021), vol. 97, 103768.
- [58] Wasik A., McCourt J., Buchgraber M., Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection-development and single-laboratory validation, *Journal of Chromatography A* (2007), vol. 1157, no. 1-2, 187-196.
- [59] Gui J. Y., Sun W., Zhang C.L., Zhang Y.T., Zhang L., Liu F., An innovative approach to sensitive artificial sweeteners analysis by ion chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (2016), vol. 44, no. 3, 361-366.
- [60] Nambiar A.P., Sanyal M., Shrivastav P.S., 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* (2018), vol. 1572, 152-161.

- [61] Stojkovic M., Mai T. D., Hauser P. C., Determination of artificial sweeteners by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection optimized by hydrodynamic pumping, *Analytica Chimica Acta* (2013), vol. 787, 254-259.
- [62] Herrmannová M., Křivánková L., Bartoš M., Vytřas K., Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis, *J. Sep. Science* (2006), vol. 29, no. 8, 1132-1137.
- [63] Boyce M. C., Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A* (1999), vol. 847, no. 1-2, 369-375.
- [64] Frazier R.A., Inns E.L., Dossi N., Ames J.M., Nursten H.E., Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks, *Journal of Chromatography A* (2000), vol. 876, no. 1-2, 213-220.
- [65] Hashemi M., Habibi A., Jahanshahi N., Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection, *Food Chemistry* (2011), vol. 124, no. 3, 1258-1263.
- [66] Kawabe T., Tomitsuka T., Kajiro T., Kishi N., Toyo'oka T., Ternary isocratic mobile phase optimization utilizing resolution Design Space based on retention time and peak width modeling, *Journal of Chromatography A* (2013), vol. 1273, 95-104.
- [67] Vanova J., Malinak D., Andrys R., Kubat M., Mikysek T., Rousarova E., Musilek K., Rousar T., Cesla P., Optimization of gradient reversed phase high performance liquid chromatography analysis of acetaminophen oxidation metabolites using linear and non-linear retention model, *Journal of Chromatography A* (2022), vol. 1669, 462956.

## Přílohy

Tabulka P1: Tabulka naměřených dat k vyhodnocení mimikolonových příspěvků při průtoku 300  $\mu$ l

	$t_1$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	1,806	293547,24	0,056	50,90
Toulen	1,949	341874,09	0,055	49,28
Ethylbenzen	2,117	403352,01	0,061	60,59
Propylbenzen	2,373	506801,61	0,058	54,98
Butylbenzen	2,714	662921,64	0,063	65,03
Pentylbenzen	3,174	906684,84	0,067	73,08
	$t_2$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	1,806	293547,24	0,056	51,08
Toulen	1,951	342576,09	0,055	49,63
Ethylbenzen	2,122	405259,56	0,063	64,62
Propylbenzen	2,386	512369,64	0,066	70,27
Butylbenzen	2,737	674205,21	0,065	68,36
Pentylbenzen	3,209	926791,29	0,076	94,49
	$t_3$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	1,809	294523,29	0,061	59,60
Toulen	1,958	345038,76	0,056	49,99
Ethylbenzen	2,133	409472,01	0,057	51,81
Propylbenzen	2,402	519264,36	0,059	57,27
Butylbenzen	2,761	686080,89	0,075	91,54
Pentylbenzen	3,244	947118,24	0,092	136,78



Tabulka P2: Tabulka naměřených dat k vyhodnocení mimikolonových příspěvků při průtoku 200  $\mu\text{l}$

	$t_1(\text{min})$	$V_r^2 (\mu\text{l}^2)$	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ ( $\text{min}^2$ )
Benzen	2,721	296153,64	0,079	45,02
Toulen	2,952	348572,16	0,090	58,04
ethylbenzen	3,214	413191,84	0,083	49,57
propylbenzen	3,652	533484,16	0,085	51,75
butylbenzen	4,171	695889,64	0,091	59,87
pentylbenzen	4,905	962361,00	0,106	81,20
	$t_2(\text{min})$	$V_r^2 (\mu\text{l}^2)$	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ ( $\text{min}^2$ )
Benzen	2,719	295718,44	0,080	45,82
Toulen	2,944	346685,44	0,078	44,34
Ethylbenzen	3,212	412677,76	0,098	69,28
Propylbenzen	3,612	521861,76	0,090	58,69
Butylbenzen	4,152	689564,16	0,110	87,28
Pentylbenzen	4,88	952576,00	0,123	109,13
	$t_3(\text{min})$	$V_r^2 (\mu\text{l}^2)$	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ ( $\text{min}^2$ )
Benzen	2,718	295500,96	0,086	52,86
Toulen	2,944	346685,44	0,084	50,54
ethylbenzen	3,202	410112,16	0,116	97,40
propylbenzen	3,611	521572,84	0,090	57,78
butylbenzen	4,153	689896,36	0,091	59,73
pentylbenzen	4,883	953747,56	0,161	186,52

Tabulka P3: Tabulka naměřených dat k vyhodnocení mimikolonových příspěvků při průtoku 100  $\mu$ l

	$t_1$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	5,381	289551,61	0,209	79,00
Toulen	5,869	344451,61	0,157	44,34
Ethylbenzen	6,39	408321,00	0,190	65,31
Propylbenzen	7,208	519552,64	0,201	72,79
Butylbenzen	8,282	685915,24	0,140	35,40
Pentylbenzen	9,758	952185,64	0,196	69,21
	$t_2$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	5,399	291492,01	0,165	49,28
Toulen	5,839	340939,21	0,148	39,34
Ethylbenzen	6,361	404623,21	0,161	46,69
Propylbenzen	7,124	507513,76	0,209	79,00
Butylbenzen	8,159	665692,81	0,212	81,05
Pentylbenzen	9,598	921216,04	0,164	48,50
	$t_3$ (min)	$V_r^2$ ( $\mu$ l <sup>2</sup> )	$w_{0,5}$ (min)	$\sigma^2_{\text{celkový}}$ (min <sup>2</sup> )
Benzen	5,377	289121,29	0,177	56,31
Toulen	5,829	339772,41	0,203	73,95
Ethylbenzen	6,342	402209,64	0,190	64,76
Propylbenzen	7,147	510796,09	0,207	77,20
Butylbenzen	8,229	677164,41	0,207	77,05
Pentylbenzen	9,644	930067,36	0,198	70,49

*Tabulka P4: Mrtvé objemy, časy a pórovitost kolony Luna Sugar Omega*

průtok = 300 $\mu\text{l}/\text{min}$	$t_{M1}$ (min)	$t_{M2}$ (min)	$t_{M3}$ (min)	$t_{M \emptyset}$ (min)	$\sigma(t_M)$ (min)	$V_M$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_G$	$\epsilon_T$
50 % v/v ACN	2,385	2,293	2,295	2,324	0,043	697,3	1060,29	0,658
75 % ACN	2,261	2,259	2,254	2,258	0,003	677,4	1060,29	0,639
90 % ACN	2,47	2,469	2,471	2,47	0,001	741	1060,29	0,699

*Tabulka P5: Mrtvé objemy, časy a pórovitost kolony Luna Hilic*

průtok = 300 $\mu\text{l}/\text{min}$	$t_{M1}$ (min)	$t_{M2}$ (min)	$t_{M3}$ (min)	$t_{M \emptyset}$ (min)	$\sigma(t_M)$ (min)	$V_M$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_G$	$\epsilon_T$
50 % ACN	3,143	3,065	3,069	3,092	0,036	927,7	1060,29	0,875
75 % ACN	2,549	2,546	2,547	2,547	0,001	764,2	1060,29	0,721
90 % ACN	2,646	2,635	2,635	2,639	0,005	791,6	1060,29	0,747

*Tabulka P6: Mrtvé objemy, časy a pórovitost kolony YMC-Triart Diol*

průtok = 200 $\mu\text{l}/\text{min}$	$t_{M1}$ (min)	$t_{M2}$ (min)	$t_{M3}$ (min)	$t_{M \emptyset}$ (min)	$\sigma(t_M)$ (min)	$V_M$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_G$	$\epsilon_T$
50 % ACN	1,748	1,752	1,752	1,752	0,002	350,4	471,24	0,744
75 % ACN	1,593	1,583	1,581	1,581	0,005	316,2	471,24	0,671
90 % ACN	1,752	1,751	1,757	1,757	0,003	351,4	471,24	0,746

*Tabulka P7: Mrtvé objemy, časy a pórovitost kolony InfinityLab Poroshell*

průtok = 200 $\mu\text{l}/\text{min}$	$t_{M1}$ (min)	$t_{M2}$ (min)	$t_{M3}$ (min)	$t_{M \emptyset}$ (min)	$\sigma(t_M)$ (min)	$V_M$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_G$	$\epsilon_T$
50 % ACN	1,729	1,645	1,625	1,666	0,045	333,3	505,06	0,660
75 % ACN	1,75	1,622	1,62	1,664	0,061	332,8	505,06	0,659
90 % ACN	1,753	1,756	1,757	1,755	0,002	351,1	505,06	0,695

*Tabulka P8: Mrtvé objemy, časy a pórovitosť kolony Ascentis Express*

prútok = 200 $\mu\text{l}/\text{min}$	$t_{M1}$ (min)	$t_{M2}$ (min)	$t_{M3}$ (min)	$t_{M \varnothing}$ (min)	$\sigma(t_M)$ (min)	$V_M$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_G$	$\epsilon_T$
50 % ACN	1,352	1,239	1,214	1,268	0,060	253,67	336,71	0,753
75 % ACN	1,197	1,194	1,194	1,195	0,001	239,0	336,71	0,710
90 % ACN	1,247	1,249	1,249	1,248	0,001	249,67	336,71	0,742

Tabulka P9: Průměrné retenční časy a retenční faktory naměřené na koloně Luna Hilic

Mobilní fáze	tø (min) CYK	k	tø (min) SU	k	tø (min) ACE-K	k	tø (min) NEO	k	tø (min) ADV	k	tø (min) SACH	k	tø (min) ASP	k
1	2,470	-0,030	2,736	0,074	2,422	-0,049	2,621	0,029	2,629	0,032	2,461	-0,034	2,797	0,098
2	2,513	-0,014	2,743	0,077	2,435	-0,044	2,617	0,027	2,646	0,039	2,478	-0,027	2,855	0,120
3	2,631	0,033	2,763	0,085	2,478	-0,027	2,595	0,019	2,645	0,038	2,561	0,005	3,022	0,186
4	2,638	0,035	2,847	0,118	2,524	-0,009	2,758	0,083	2,800	0,099	2,584	0,014	3,285	0,289
5	2,756	0,082	2,914	0,144	2,568	0,008	2,831	0,111	2,896	0,137	2,658	0,043	3,562	0,398
6	3,125	0,227	3,087	0,212	2,716	0,066	3,058	0,200	3,121	0,225	2,870	0,127	4,671	0,834
7	3,068	0,204	3,171	0,245	2,707	0,063	3,570	0,401	3,953	0,552	2,857	0,121	6,918	1,716
8	3,971	0,559	3,821	0,500	2,753	0,081	5,749	1,257	7,254	1,848	3,060	0,201	19,774	6,762
9	6,061	1,380	5,587	1,193	2,858	0,122	10,484	3,116	15,679	5,155	3,431	0,347	47,698	17,724

Tabulka P10: Průměrné retenční časy a retenční faktory naměřené na koloně Luna Sugar Omega

Mobilní fáze	t <sub>0</sub> (min) CYK	k	t <sub>0</sub> (min) SU	k	t <sub>0</sub> (min) ACE-K	k	t <sub>0</sub> (min) NEO	k	t <sub>0</sub> (min) ADV	k	t <sub>0</sub> (min) SACH	k	t <sub>0</sub> (min) ASP	k
1	5,562	1,463	2,755	0,220	4,556	1,018	3,380	0,497	3,873	0,715	4,798	1,125	5,267	1,332
2	5,184	1,296	2,758	0,221	4,260	0,886	3,229	0,430	3,642	0,612	4,466	0,978	5,151	1,281
3	5,126	1,270	2,769	0,226	3,754	0,663	3,047	0,349	3,386	0,499	4,011	0,776	5,161	1,286
4	5,627	1,492	2,947	0,305	4,284	0,897	4,443	0,968	5,481	1,427	5,001	1,215	9,345	3,138
5	5,171	1,290	3,041	0,347	3,647	0,615	4,335	0,920	5,260	1,330	3,951	0,750	9,659	3,278
6	5,131	1,272	3,261	0,444	3,251	0,440	4,064	0,800	5,395	1,389	3,586	0,588	12,076	4,348
7	7,319	2,241	3,806	0,685	3,496	0,548	14,337	5,349	20,066	7,886	4,034	0,786	24,175	9,946
8	9,642	3,270	5,550	1,458	3,290	0,457	30,390	12,459	61,599	26,280	3,627	0,606		
9	14,101	5,245	10,532	3,664	3,236	0,433	55,455	23,559	89,634	38,696	3,899	0,727		

Tabulka P11: Průměrné retenční časy a retenční faktory naměřené na koloně YMC-Triart Diol

Mobilní fáze	t <sub>0</sub> (min) CYK	k	t <sub>0</sub> (min) SU	k	t <sub>0</sub> (min) ACE-K	k	t <sub>0</sub> (min) NEO	k	t <sub>0</sub> (min) ADV	k	t <sub>0</sub> (min) SACH	k	t <sub>0</sub> (min) ASP	k
1	1,801	0,139	2,029	0,283	1,718	0,087	1,999	0,264	1,993	0,260	1,756	0,111	2,178	0,377
2	1,855	0,173	2,046	0,294	1,752	0,108	2,016	0,275	2,062	0,304	1,801	0,139	2,291	0,449
3	1,951	0,322	2,090	0,149	1,817	0,273	2,013	0,305	2,063	0,177	1,861	0,569	2,480	0,569
4	1,901	0,202	2,130	0,347	1,757	0,111	2,201	0,392	2,205	0,394	1,806	0,142	2,721	0,720
5	2,024	0,280	2,194	0,388	1,816	0,148	2,292	0,449	2,307	0,459	1,880	0,189	3,092	0,955
6	2,427	0,535	2,412	0,526	1,953	0,235	2,434	0,540	2,454	0,552	2,107	0,332	4,562	1,885
7	2,049	0,296	2,347	0,484	1,757	0,111	3,190	1,017	3,446	1,180	1,841	0,164	6,970	3,409
8	2,640	0,670	2,770	0,752	1,769	0,119	9,026	4,709	10,304	5,517	1,942	0,228	28,887	15,374
9	4,219	1,669	3,736	1,363	1,857	0,174	17,418	10,017	21,961	12,891	2,166	0,370	60,156	37,049

Tabulka P12: Průměrné retenční časy a retenční faktory naměřené na koloně Ascentis Express

Mobilní fáze	t <sub>0</sub> (min) CYK	k	t <sub>0</sub> (min) SU	k	t <sub>0</sub> (min) ACE-K	k	t <sub>0</sub> (min) NEO	k	t <sub>0</sub> (min) ADV	k	t <sub>0</sub> (min) SACH	k	t <sub>0</sub> (min) ASP	k
1	1,220	0,021	1,405	0,175	1,184	-0,010	1,491	0,248	1,451	0,214	1,594	0,334	1,639	0,371
2	1,228	0,028	1,411	0,180	1,192	-0,003	1,486	0,243	1,474	0,233	1,211	0,013	1,697	0,420
3	1,275	0,067	1,416	0,185	1,223	0,023	1,488	0,245	1,460	0,222	1,234	0,032	1,799	0,505
4	1,250	0,046	1,417	0,186	1,185	-0,009	1,685	0,410	1,575	0,318	1,215	0,016	2,315	0,937
5	1,304	0,091	1,455	0,218	1,222	0,023	1,720	0,439	1,633	0,367	1,229	0,028	2,837	1,374
6	1,475	0,234	1,556	0,302	1,274	0,066	1,597	0,336	2,093	0,752	1,311	0,097	3,740	2,129
7	1,366	0,143	1,487	0,244	1,180	-0,013	4,311	2,607	4,218	2,529	1,188	-0,006	11,148	8,329
8	1,705	0,426	1,668	0,395	2,383	0,994	13,515	10,309	26,552	21,219	1,231	0,030	44,316	36,084
9	2,341	0,959	2,054	0,718	1,278	0,069	26,532	21,202	30,792	24,767	1,412	0,181		



Tabulka P13: Průměrné retenční časy a retenční faktory naměřené na koloně InfinityLab Poroshell

Mobilní fáze	tø (min) CYK	k	tø (min) SU	k	tø (min) ACE-K	k	tø (min) NEO	k	tø (min) ADV	k	tø (min) SACH	k	tø (min) ASP	k
1	1,903	0,141	1,957	0,174	1,855	0,113	1,818	0,090	1,856	0,113	1,900	0,140	2,015	0,209
2	1,943	0,166	1,944	0,166	1,852	0,111	1,805	0,083	1,822	0,093	1,900	0,140	2,064	0,239
3	2,002	0,201	1,939	0,164	1,884	0,131	1,766	0,060	1,811	0,088	1,944	0,166	2,205	0,323
4	2,092	0,256	2,090	0,254	1,992	0,195	1,996	0,198	2,100	0,260	2,052	0,231	2,674	0,604
5	2,144	0,286	2,132	0,280	1,995	0,197	2,046	0,228	2,137	0,283	2,094	0,256	3,063	0,838
6	2,591	0,555	2,135	0,281	2,043	0,226	2,103	0,262	2,149	0,290	2,140	0,284	3,908	1,345
7	2,923	0,754	4,546	1,728	2,286	0,372	2,337	0,403	4,845	1,907	2,389	0,434	8,524	4,115
8	5,652	2,392	6,916	3,150	2,479	0,487	5,273	2,164	12,508	6,506	2,560	0,536	25,680	14,411
9	9,345	4,608	8,764	4,259	2,926	0,756	8,267	3,961	19,952	10,974	2,949	0,770	69,490	40,702

Tabulka P14: Parametry nelineární regrese logaritmů retenčních faktorů (rovnice 11) naměřených na koloně Luna Hilic

Látka	$p_0$	$\sigma(p_0)$ p	$p_1$	$\sigma(p_1)$ p	$p_2$	$\sigma(p_2)$ p	$p_3$	$\sigma(p_3)$ p	$p_4$	$\sigma(p_4)$ p	$p_5$	$\sigma(p_5)$ p	$R^2$
CYK	0,651	1,332 0,711	-3,184	1,799 0,327	2,359	0,666 0,175	-10,290	1,779 0,109	5,352	0,868 0,102	5,534	0,829 0,095	1,0000
SU	14,377	4,629 0,053	-21,046	4,889 0,023	7,304	2,456 0,059	-18,966	8,492 0,112	5,401	4,528 0,319	13,217	2,413 0,012	0,9952
SACH	-41,344	0,535 0,008	64,134	0,722 0,007	-23,966	0,268 0,007	16,518	0,714 0,028	1,514	0,348 0,144	-17,320	0,333 0,012	1,0000
ADV	18,708	7,375 0,085	-35,162	7,789 0,020	14,127	3,927 0,037	-19,241	13,529 0,250	2,990	7,215 0,706	19,709	3,845 0,014	0,9967
NEO	17,341	4,064 0,024	-29,528	4,292 0,006	9,081	2,164 0,025	-21,020	7,455 0,067	2,197	3,976 0,619	22,841	2,119 0,002	0,9990
ASP	21,188	7,500 0,066	-37,018	7,920 0,018	16,592	3,993 0,025	-22,492	13,757 0,201	6,348	7,336 0,451	17,091	3,910 0,022	0,9966

Červeně jsou zvýrazněné statisticky významné parametry ( $p < 0,05$ )

Tabulka P15: Parametry nelineární regrese logaritmů retenčních faktorů (rovnice 11) naměřených na koloně Luna Omega Sugar

Látka	p <sub>0</sub>	σ (p <sub>0</sub> ) p	p <sub>1</sub>	σ (p <sub>1</sub> ) p	p <sub>2</sub>	σ (p <sub>2</sub> ) p	p <sub>3</sub>	σ (p <sub>3</sub> ) p	p <sub>4</sub>	σ (p <sub>4</sub> ) p	p <sub>5</sub>	σ (p <sub>5</sub> ) p	R <sup>2</sup>
CYK	16,349	6,603 0,090	-24,884	6,973 0,038	10,716	3,516 0,056	-14,890	12,112 0,307	4,213	6,459 0,561	9,375	3,442 0,072	0,9664
SU	19,268	7,182 0,075	-30,359	7,585 0,028	11,830	3,824 0,054	-20,262	13,175 0,222	5,130	7,026 0,518	15,204	3,744 0,027	0,9892
ACE-K	2,047	3,922 0,638	-1,770	4,142 0,698	-0,122	2,088 0,957	-1,468	7,195 0,851	-0,299	3,837 0,943	1,179	2,045 0,605	0,9716
SACH	5,598	5,689 0,398	-1,707	6,008 0,795	-0,404	3,029 0,902	-9,786	10,435 0,418	3,985	5,565 0,526	2,101	2,966 0,530	0,8951
ADV	24,357	9,872 0,090	-49,759	10,425 0,017	22,576	5,256 0,023	-14,032	18,109 0,495	-0,619	9,657 0,953	19,564	5,147 0,032	0,9928
NEO	25,303	11,078 0,107	-47,765	11,699 0,027	21,827	5,899 0,034	-17,954	20,322 0,442	1,994	10,837 0,866	18,398	5,775 0,050	0,9899
ASP	6,449	2,731 0,255	-7,960	3,838 0,286	3,930	1,580 0,243	-9,848	4,408 0,268	3,260	2,282 0,389	5,575	1,891 0,208	0,9929

Červeně jsou zvýrazněné statisticky významné parametry (p < 0,05)

Tabulka P16: Parametry nelineární regrese logaritmu retenčních faktorů (rovnice 11) naměřených na koloně YMC-Triart Diol

Látka	p <sub>0</sub>	σ (p <sub>0</sub> ) p	p <sub>1</sub>	σ (p <sub>1</sub> ) p	p <sub>2</sub>	σ (p <sub>2</sub> ) p	p <sub>3</sub>	σ (p <sub>3</sub> ) p	p <sub>4</sub>	σ (p <sub>4</sub> ) p	p <sub>5</sub>	σ (p <sub>5</sub> ) p	R <sup>2</sup>
CYK	10,907	4,188 0,080	-13,055	4,423 0,060	4,628	2,230 0,130	-17,891	7,682 0,102	7,626	4,097 0,160	8,148	2,183 0,034	0,9942
SU	8,100	6,060 0,274	-13,081	6,399 0,134	1,444	3,226 0,685	-9,191	11,115 0,469	-1,081	5,928 0,867	14,076	3,159 0,021	0,9817
ACE-K	-2,571	2,876 0,437	11,156	3,037 0,035	-3,533	1,531 0,104	-8,181	5,275 0,219	8,219	2,813 0,061	-5,903	1,499 0,029	0,9890
SACH	2,982	6,921 0,696	2,886	7,309 0,719	1,782	3,685 0,662	-13,648	12,696 0,361	11,840	6,770 0,179	-6,268	3,608 0,181	0,9669
ADV	22,627	10,541 0,121	-50,728	11,131 0,020	19,505	5,612 0,040	-10,136	19,335 0,636	-5,045	10,311 0,658	25,314	5,495 0,019	0,9896
NEO	22,454	11,945 0,157	-46,479	12,614 0,035	19,406	6,360 0,055	-13,555	21,911 0,580	-0,589	11,685 0,963	20,160	6,227 0,048	0,9836
ASP	24,022	7,888 0,056	-45,022	8,330 0,012	19,678	4,200 0,018	-19,506	14,469 0,270	3,521	7,716 0,679	19,352	4,112 0,018	0,9953

Červeně jsou zvýrazněné statisticky významné parametry ( $p < 0,05$ )

Tabulka P18: Parametry nelineární regrese logaritmů retenčních faktorů (rovnice 11) naměřených na koloně Ascentis Express

Látka	$p_0$	$\sigma(p_0)$ p	$p_1$	$\sigma(p_1)$ p	$p_2$	$\sigma(p_2)$ p	$p_3$	$\sigma(p_3)$ P	$p_4$	$\sigma(p_4)$ p	$p_5$	$\sigma(p_5)$ p	$R^2$
CYK	6,623	3,157 0,127	-10,702	3,334 0,049	4,668	1,681 0,069	-14,355	5,791 0,089	6,423	3,088 0,129	7,588	1,646 0,019	0,9988
SU	9,631	2,138 0,020	-13,972	2,258 0,009	4,306	1,138 0,032	-12,378	3,922 0,051	3,376	2,091 0,205	9,011	1,115 0,004	0,9959
SACH	27,288	11,747 0,103	-66,944	12,405 0,012	31,370	6,255 0,015	-7,739	21,547 0,743	-4,907	11,491 0,698	23,051	6,124 0,033	0,8960
ADV	27,288	11,747 0,103	-66,944	12,405 0,012	31,370	6,255 0,015	-7,739	21,547 0,743	-4,907	11,491 0,698	23,051	6,124 0,033	0,9926
NEO	29,899	16,543 0,168	-64,957	17,471 0,034	30,684	8,808 0,040	-13,996	30,346 0,676	-1,181	16,183 0,946	21,402	8,624 0,089	0,9820
ASP	15,951	10,998 0,284	-42,073	10,878 0,061	20,880	4,645 0,046	-4,384	18,396 0,834	-3,256	8,932 0,750	15,090	6,090 0,131	0,9963

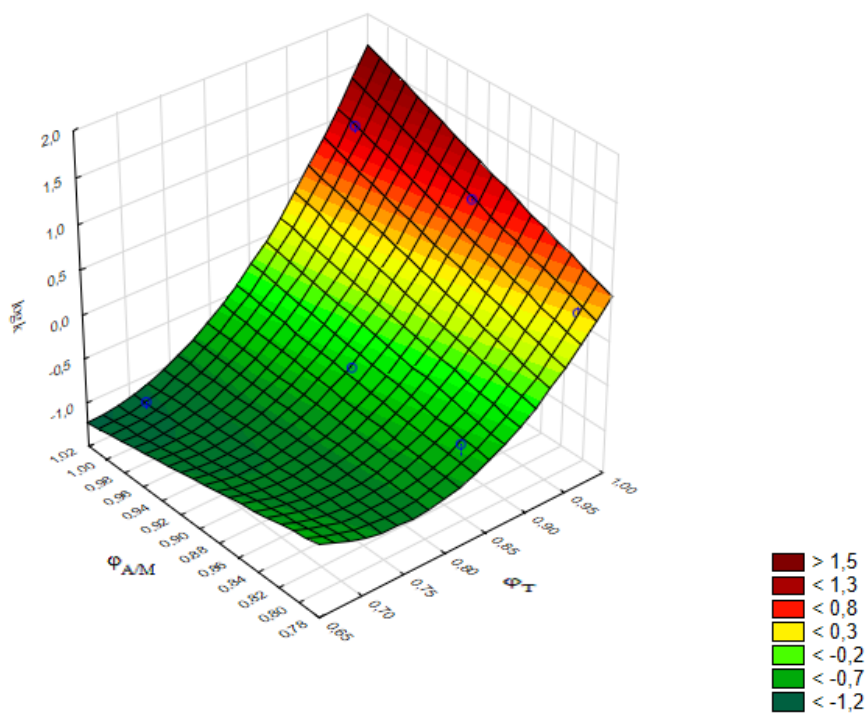
Červeně jsou zvýrazněné statisticky významné parametry ( $p < 0,05$ )

Tabulka P18: Parametry nelineární regrese logaritmů retenčních faktorů (rovnice 11) naměřených na koloně InfinityLab Poroshell

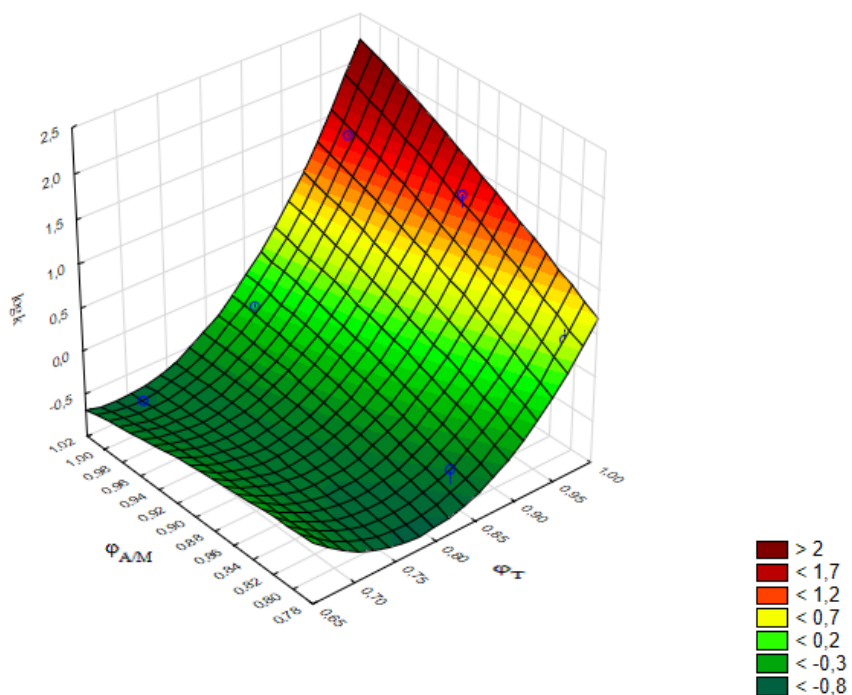
Látka	p <sub>0</sub>	σ (p <sub>0</sub> ) p	p <sub>1</sub>	σ (p <sub>1</sub> ) p	p <sub>2</sub>	σ (p <sub>2</sub> ) p	p <sub>3</sub>	σ (p <sub>3</sub> ) p	p <sub>4</sub>	σ (p <sub>4</sub> ) p	p <sub>5</sub>	σ (p <sub>5</sub> ) p	R <sup>2</sup>
CYK	17,435	6,451 0,074	-31,346	6,812 0,019	13,465	3,435 0,030	-16,797	11,833 0,251	4,008	6,310 0,570	14,252	3,363 0,024	0,9945
SU	20,281	6,168 0,046	-43,392	6,514 0,007	22,524	3,284 0,006	-11,259	11,314 0,393	1,536	6,034 0,816	11,365	3,216 0,039	0,9958
ACE-K	8,082	4,009 0,137	-10,556	4,234 0,088	4,621	2,134 0,119	-12,787	7,354 0,180	4,896	3,921 0,300	5,753	2,090 0,071	0,9929
SACH	5,164	2,895 0,173	-6,945	3,058 0,108	3,153	1,542 0,133	-9,160	5,311 0,183	3,562	2,832 0,298	4,220	1,509 0,068	0,9954
ADV	24,673	9,868 0,088	-50,541	10,421 0,017	23,027	5,254 0,022	-16,578	18,101 0,427	0,567	9,653 0,957	20,422	5,144 0,029	0,9943
NEO	6,449	2,731 0,255	-7,960	3,838 0,286	3,930	1,580 0,243	-9,848	4,408 0,268	3,260	2,282 0,389	5,575	1,891 0,208	0,9912
ASP	23,482	8,891 0,078	-41,295	9,390 0,022	18,479	4,734 0,030	-22,858	16,310 0,256	5,656	8,698 0,562	18,608	4,635 0,028	0,9955

Červeně jsou zvýrazněné statisticky významné parametry ( $p < 0,05$ )

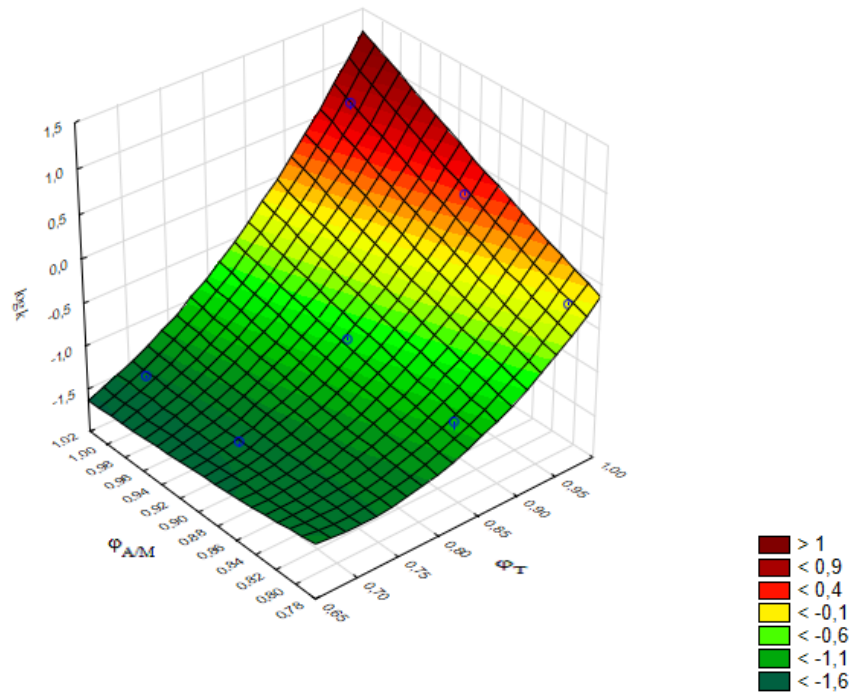
Obrázek P19: Grafické znázornění parametrů advantamu (rovnice 11) na koloně InfinityLab Poroshell



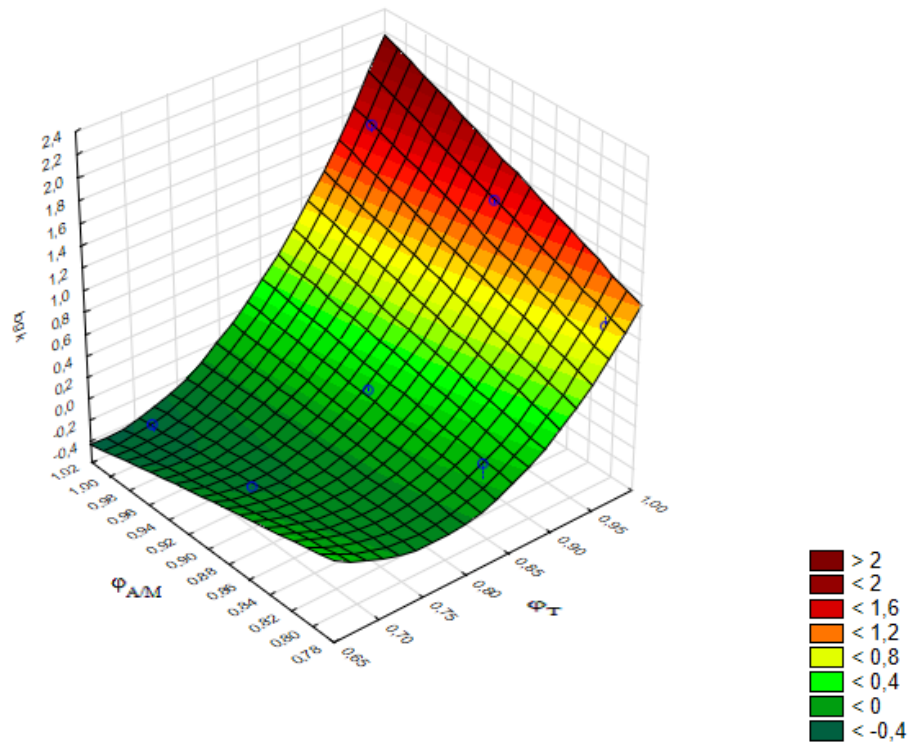
Obrázek P20: Grafické znázornění parametrů advantamu (rovnice 11) na koloně Ascentis Express



Obrázek P21: Grafické znázornění parametrů advtantamu (rovnice 11) na koloně Luna Hilic

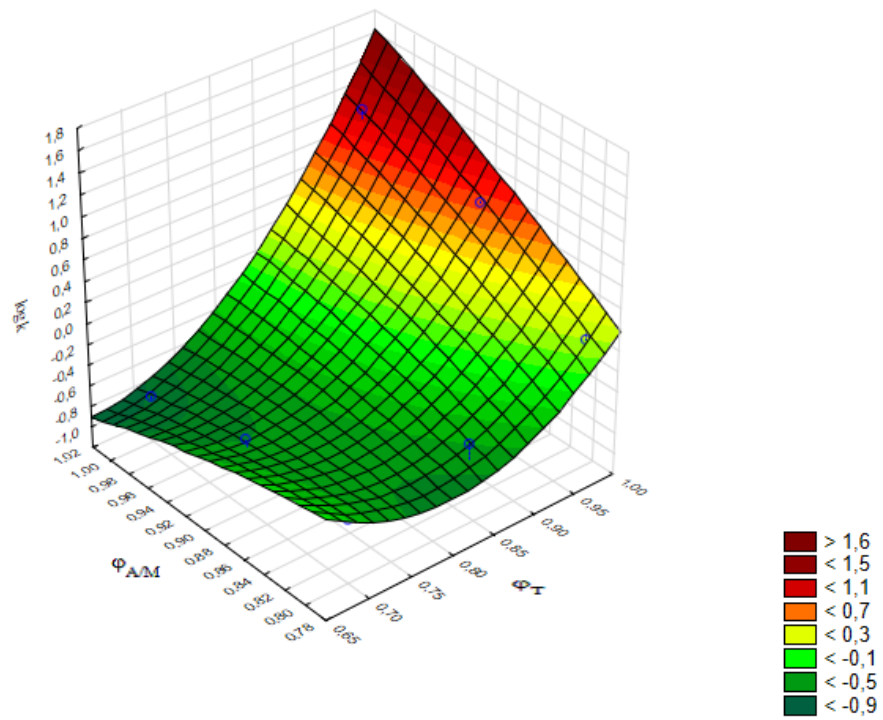


Obrázek P22: Grafické znázornění parametrů advtantamu (rovnice 11) na koloně Luna Omega Sugar

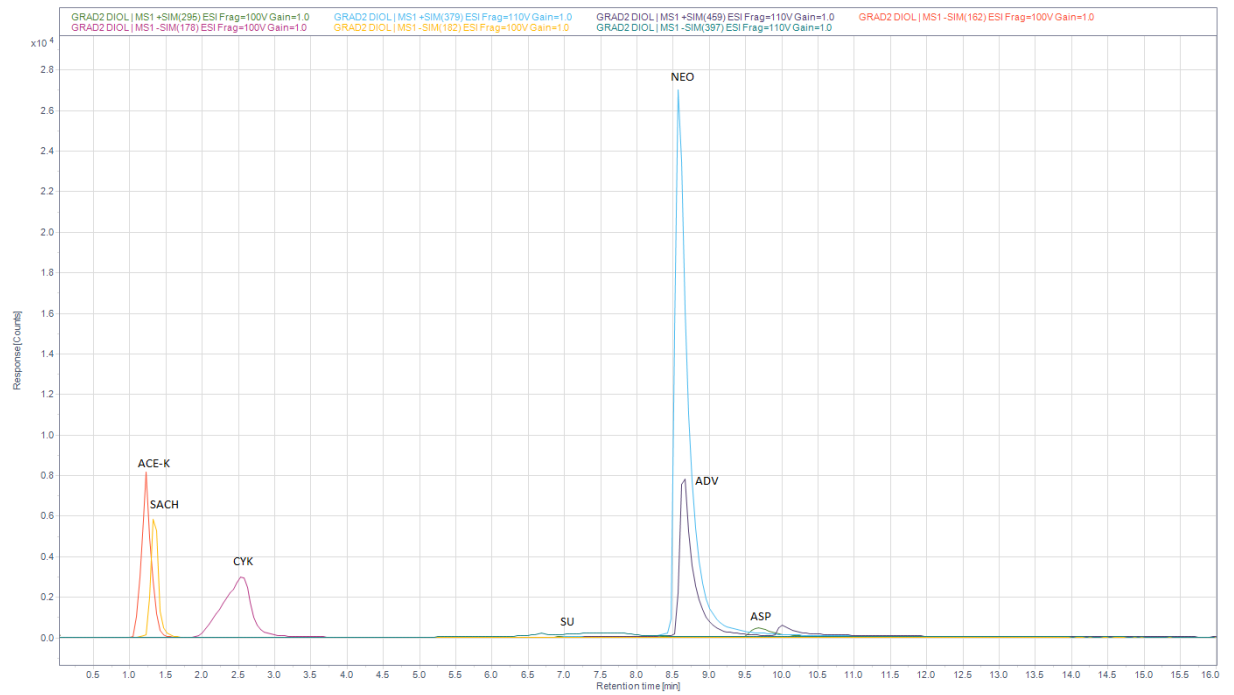




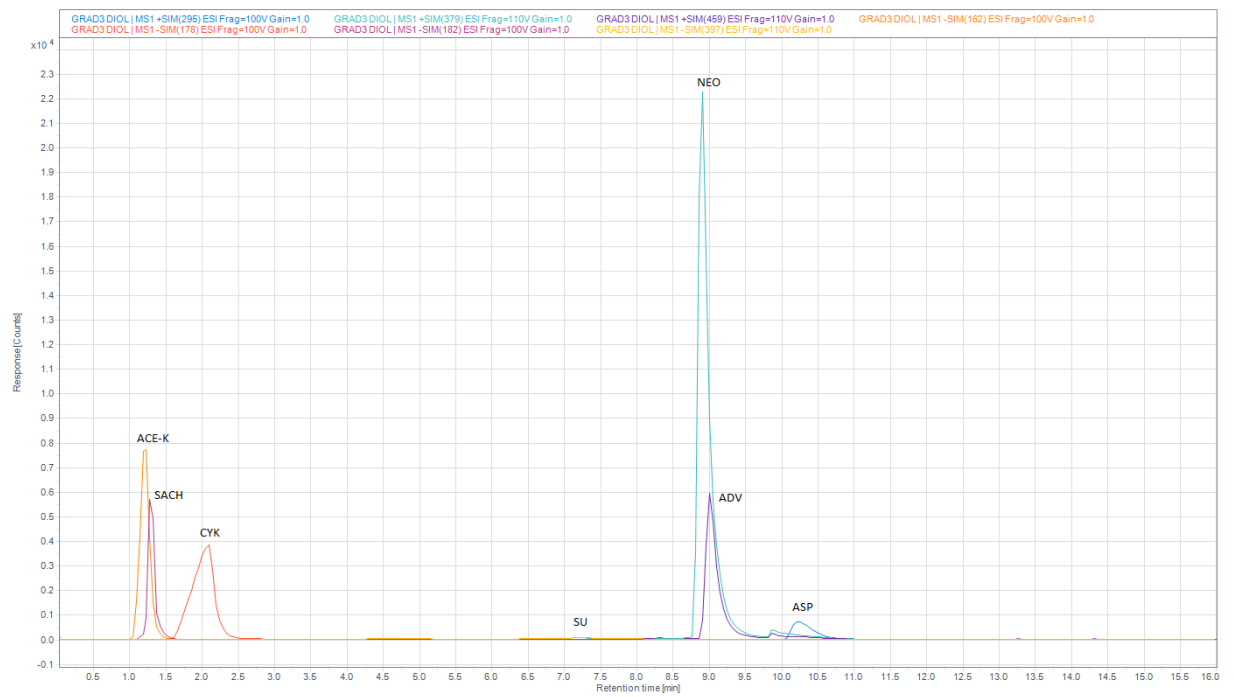
Obrázek P23: Grafické znázornění parametrů advantamu (rovnice 11) na koloně YMC-Triart Diol



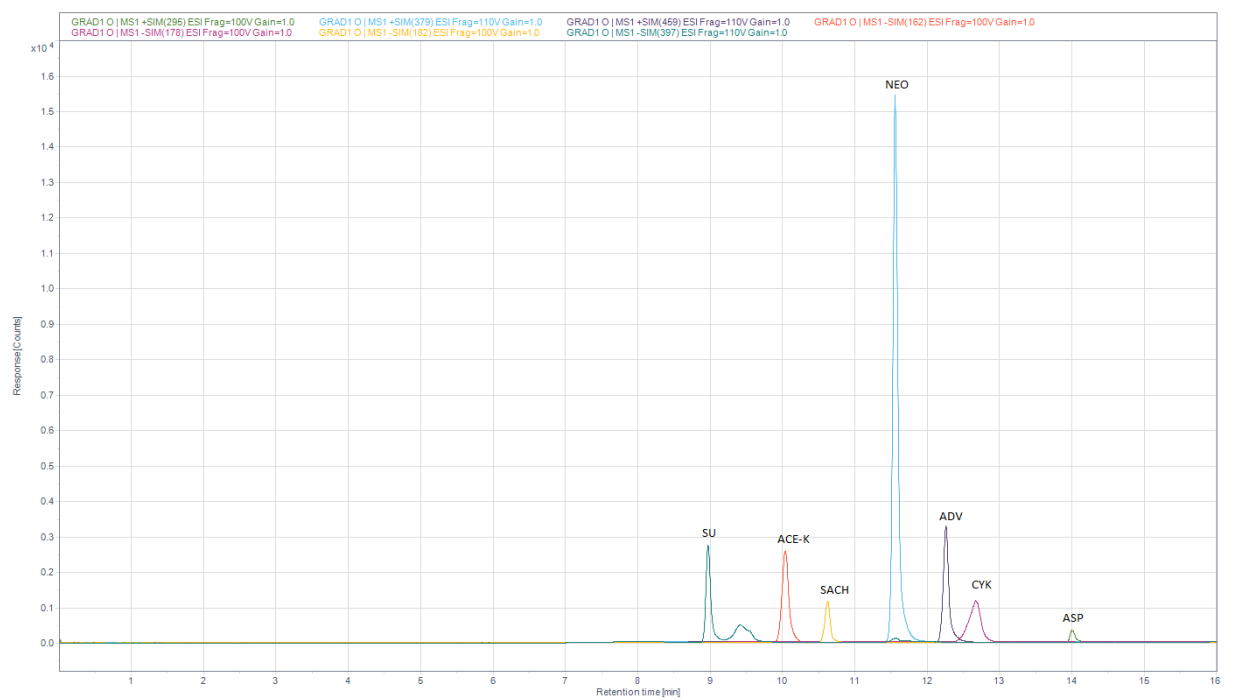
Obrázek P24: Gradient č.2 na koloně YMC-Triart Diol



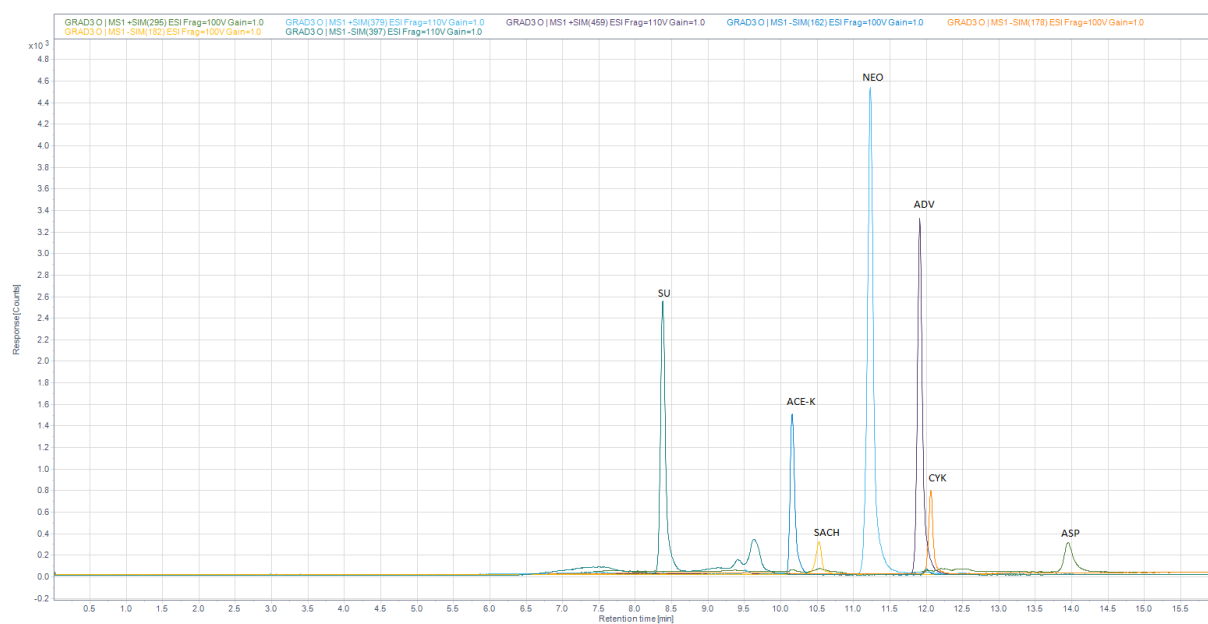
Obrázek P25: Gradient č.3 na koloně YMC-Triart Diol



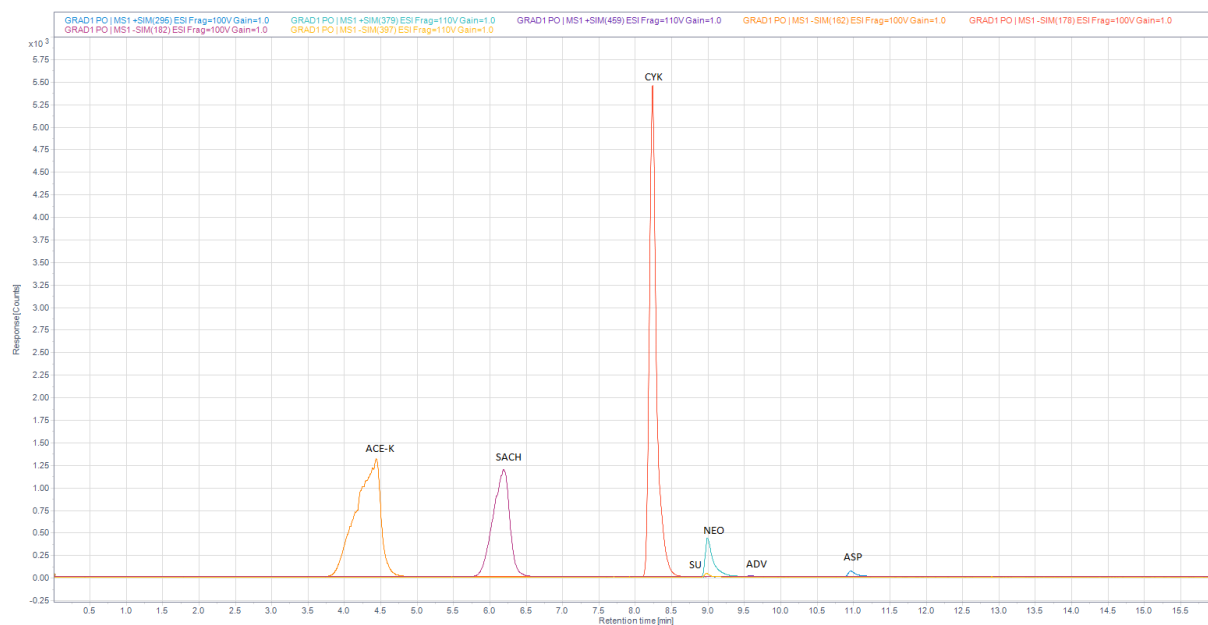
Obrázek P26: Gradient č.1 na koloně Luna Omega Sugar



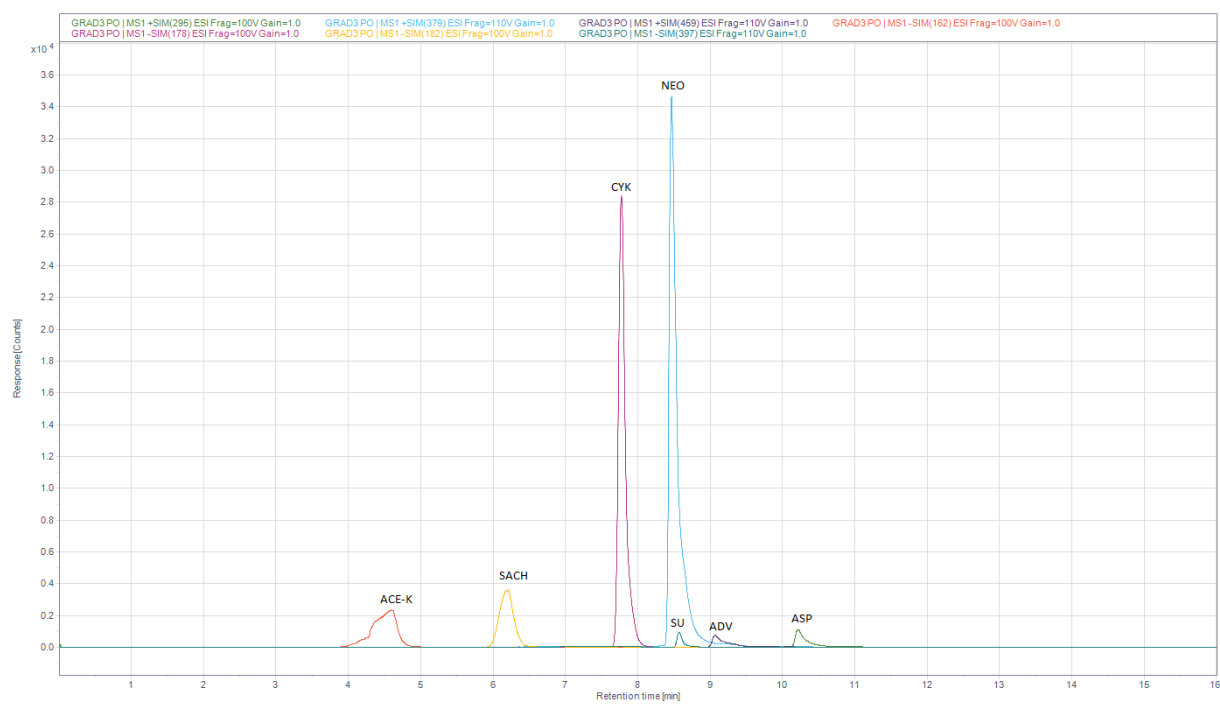
Obrázek P27: Gradient č.3 na koloně Luna Omega Sugar



Obrázek P28: Gradient č.1 na koloně InfinityLab Poroshell



Obrázek P29: Gradient č.3 na koloně InfinityLab Poroshell



P30: Průměrné retenční časy  $U_S$ ,  $\varphi_{T,e}$ ,  $\varphi_{A/M,e}$  při použití gradientu na koloně YMC-Triart Diol

Látka	Gradient č. 1 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	Gradient č. 2 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$	Gradient č. 3 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$
CYK	2,526	0,925	0,598	2,573	0,924	0,627	0,865	2,478	0,927	0,567	0,936
ACE-K	1,235	0,968	-0,219	1,235	0,968	-0,219	0,954	1,235	0,968	-0,219	0,977
SU	7,543	0,762	3,771	7,111	0,776	3,498	0,563	7,303	0,769	3,619	0,775
NEO	9,627	0,693	5,089	8,620	0,776	4,452	0,462	9,004	0,714	4,695	0,718
ADV	9,815	0,687	5,208	8,665	0,725	4,481	0,459	9,096	0,711	4,753	0,715
ASP	11,252	0,640	6,117	9,726	0,690	5,152	0,388	10,253	0,673	5,485	0,677
SACH	1,325	0,695	-0,162	1,372	0,963	-0,132	0,945	1,325	0,965	-0,162	0,974

P31: Průměrné retenční časy US,  $\varphi_{T,e}$ ,  $\varphi_{A/M,e}$  při použití gradientu na koloně Luna Omega Sugar

Látka	Gradient č. 1 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	Gradient č. 2 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$	Gradient č. 3 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$
CYK	12,390	0,603	4,487	11,371	0,637	4,036	0,279	12,067	0,614	4,344	0,616
ACE-K	9,816	0,687	3,347	9,657	0,693	3,277	0,393	10,160	0,676	3,500	0,680
SU	9,047	0,712	3,007	8,028	0,746	2,555	0,501	8,371	0,735	2,707	0,739
NEO	11,661	0,627	4,164	10,911	0,652	3,832	0,309	11,231	0,641	3,974	0,644
ADV	12,314	0,606	4,453	11,466	0,633	4,078	0,272	11,905	0,619	4,272	0,622
ASP	14,070	0,548	5,231	13,740	0,559	5,085	0,121	13,954	0,552	5,180	0,553
SACH	10,558	0,663	3,676	9,999	0,681	3,428	0,370	10,523	0,664	3,660	0,668

P32: Průměrné retenční časy  $US$ ,  $\varphi_{T,e}$ ,  $\varphi_{A/M,e}$  při použití gradientu na koloně InfinityLab Poroshell

Látka	Gradient č. 1 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	Gradient č. 2 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$	Gradient č. 3 $t_r \varnothing$ (min)	$\varphi_{T,e}$	$k_e$	$\varphi_{A/M,e}$
CYK	8,241	0,739	3,946	7,535	0,762	3,522	0,534	7,771	0,754	3,664	0,759
ACE-K	4,427	0,863	1,657	4,738	0,853	1,843	0,721	4,481	0,862	1,689	0,869
SU	8,991	0,714	4,396	8,318	0,736	3,992	0,482	8,563	0,728	4,139	0,733
NEO	9,001	0,714	4,402	8,136	0,742	3,883	0,494	8,457	0,732	4,075	0,736
ADV	9,581	0,695	4,750	8,712	0,723	4,228	0,456	9,066	0,712	4,441	0,716
ASP	10,962	0,650	5,579	9,700	0,691	4,821	0,390	10,213	0,674	5,129	0,678
SACH	6,195	0,806	2,718	6,163	0,807	2,699	0,626	6,089	0,809	2,654	0,815

P33: Selektivita separace v gradientu na koloně Luna Omega Sugar (změna pořadí eluce látek označená červeně)

Látka	Gradient č. 1 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 2 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 3 Pořadí eluce	$\alpha_g$
SU	1		1		1	
ACE-K	2	ACE-K/SU = 1,113	2	ACE-K/SU = 1,283	2	ACE-K/SU = 1,293
SACH	3	SACH/ACE-K = 1,098	3	SACH/ACE-K = 1,046	3	SACH/ACE-K = 1,046
NEO	4	NEO/SACH = 1,133	4	NEO/SACH = 1,118	4	NEO/SACH = 1,086
ADV	5	ADV/NEO = 1,069	6	ADV/NEO = 1,064	5	ADV/NEO = 1,075
CYK	6	CYK/ADV = 1,008	5	CYK/ADV = 0,990	6	CYK/ADV = 1,017
ASP	7	ASP/CYK = 1,166	7	ASP/CYK = 1,260	7	ASP/CYK = 1,192



P34: Selektivita separace v gradientu na koloně YMC-Triart Diol (selektivita separace v gradientu není uváděna pro látky eluující před mrtvým objemem kolony)

Látka	Gradient č. 1 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 2 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 3 Pořadí eluce	$\alpha_g$
ACE-K	1		1		1	
SACH	2		2		2	
CYK	3		3		3	
SU	4	SU/CYK = 6,309	4	SU/CYK =0,179	4	SU/CYK =0,157
NEO	5	NEO/SU = 1,350	5	NEO/SU =0,786	5	NEO/SU =0,771
ADV	6	ADV/NEO = 1,023	6	ADV/NEO =0,994	6	ADV/NEO =0,988
ASP	7	ASP/ADV = 1,175	7	ASP/ADV =0,870	7	ASP/ADV =0,867

P35: Selektivita separace v gradientu na koloně InfinityLab Poroshell (změna pořadí eluce látek označená červeně)

Látka	Gradient č. 1 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 2 Pořadí eluce	$\alpha_g$	Gradient č. 3 Pořadí eluce	$\alpha_g$
ACE-K	1		1		1	
SACH	2	SACH/ACE-K = 1,640	2	SACH/ACE-K = 1,464	2	SACH/ACE-K = 1,571
CYK	3	CYK/SACH = 1,452	3	CYK/SACH = 1,305	3	CYK/SACH = 1,380
SU	4	SU/CYK = 1,114	5	SU/CYK = 1,102	5	SU/CYK = 1,112
NEO	5	NEO/SU = 1,001	4	NEO/SU = 1,028	4	NEO/SU = 1,016
ADV	6	ADV/NEO = 1,079	6	ADV/NEO = 1,059	6	ADV/NEO = 1,073
ASP	7	ASP/ADV = 1,174	7	ASP/ADV = 1,140	7	ASP/ADV = 1,155