

KRYSTYNA SZYMCZYK, LUDWIK CZERWIECKI

ZASTOSOWANIE TECHNIKI HPLC DO OZNACZANIA ASPARTAMU I ACESULFAMU-K W PRZETWORACH OWOCOWYCH

HPLC DETERMINATION OF ASPARTAME AND ACESULFAM-K IN PROCESSED FRUIT PRODUCTS

Z Zakładu Analizy Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. B. Szteke

Adoptowano metodę oznaczania środków słodzących – acesulfamu K i aspartamu w niskokalorycznych, owocowo-warzywnych sokach przecierowych. Próbkę badanych przetworów odbiałczano roztworami Carreza i po przesączeniu analizowano za pomocą techniki chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej (HPLC) w fazach odwróconych.

Niskokaloryczne produkty spożywcze zamiast cukru (sacharozy) zawierają alternatywne substancje słodzące nadające im słodki smak nie dostarczając dużej ilości kalorii. W wielu krajach dopuszczono do stosowania w żywności takie związki jak: sacharynę, cyklaminy, acesulfam K, aspartam. Zamienniki cukru wykorzystane zostały do produkcji tabletek słodzących (dla chorych na cukrzycę), różnego rodzaju bezalkoholowych napojów orzeźwiających, soków i napojów owocowych, deserów (lody, budynie, galaretki), owoców i warzyw konserwowanych, produktów mlecznych z dodatkiem owoców, sosów sałatkowych, majonezów itp. Odpowiednie akty prawne w wielu krajach świata określają maksymalne ilości poszczególnych środków słodzących jakie mogą być dodawane do produktów spożywczych [9].

W Polsce, w produktach dietetycznych zamiast cukru stosowano głównie sacharynę oraz sorbitol, mannitol i ksylitol. W 1989 r. dopuszczono do słodzenia żywności nowy środek – aspartam (ASP). Na rynku pojawiły się już produkty krajowe słodzone aspartamem – głównie napoje i dżemy, a także niskokaloryczne desery, lody, wyroby czekoladowe.

W 1993 r. dopuszczono do stosowania w produkcji żywności następny środek wysokosłodzący – acesulfam K (ACK). Podejmowane już są próby produkcji żywności dietetycznej zawierającej również ten związek.

Stosowanie pojedynczych środków wysokosłodzących w produktach niskokalorycznych daje często niepożądane efekty uboczne jak np. obcy posmak lub wiąże się z obniżeniem zawartości suchej masy w produkcie. Efekty te mogą być „maskowane” przez zastosowanie mieszaniny niewielkiej ilości cukru, często fruktozy, oraz alternatywnych środków słodzących. Stwierdzono także, że w wielu przypadkach mieszaniny syntetycznych środków słodzących działają synergicznie. tzn. otrzymana słodycz produktu jest większa niż wynikałoby to z sumy słodyczy poszczególnych składników.

W związku z tym wiele produktów niskokalorycznych słodzonych jest różnymi kompozycjami środków słodzących [1].

Do oznaczania zawartości środków wysokosłodzonych w produktach spożywczych stosowana jest głównie technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) [2, 3, 4, 5, 6, 10, 11] niekiedy w połączeniu z chromatografią par jonowych [7, 12].

Umożliwia ona w sposób stosunkowo szybki i prosty równoczesne oznaczanie aspartamu, acesulfamu-K, a także sacharyny, kofeiny i kwasu benzoowego.

W Zakładzie Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego opracowano technologie produkcji przetworów owocowo-warzywnych z zastosowaniem różnych środków słodzących – aspartamu, acesulfamu K, sorbitolu oraz ich mieszanin.

Próby wprowadzenia tego typu produktów na rynek uzasadniają potrzebę opracowywania bądź adaptacji metod analitycznych umożliwiających oznaczanie zawartości środków wysokosłodzących (acesulfamu K i aspartamu) w przetworach słodzonych tymi substancjami. Pozwoli to przede wszystkim na identyfikację stosowanych środków słodzących oraz na ocenę jakościową produktów niskokalorycznych poprzez oznaczenie w nich zawartości alternatywnych środków słodzących, których maksymalne ilości w żywności określają odpowiednie akty normatywne.

Przedstawiona praca stanowi kontynuację i rozszerzenie podjętej tematyki analitycznej Zakładu Analizy Żywności, związanej z adaptacją metod oznaczania wybranych środków słodzących w przetworach owocowych [2, 3].

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał do badań

W pierwszym etapie pracy wykonano oznaczenia zawartości acesulfamu-K i aspartamu w roztworach modelowych. Miało to na celu ocenę powtarzalności oznaczeń w roztworach zawierających tylko analizowane związki oraz ocenę wpływu procesu pasteryzacji na stabilność środków wysokosłodzących.

Przygotowano dwa roztwory modelowe o różnej zawartości aspartamu (ASP) i acesulfamu K (ACK):

I ACK – 0,0092 g/100 g, ASP – 0,0092 g/100 g,

II ACK – 0,0152 g/100 g, ASP – 0,0147 g/100 g

Substancje słodzące rozpuszczano w 0,11% roztworze kwasu cytrynowego o pH = 3,5. Dla każdego roztworu modelowego przygotowano: jedną próbkę niepasteryzowaną oraz pięć próbek poddanych jednocześnie pasteryzacji.

Następnie przystąpiono do badań czterech przetworów owocowo-warzywnych, które zostały przygotowane w Zakładzie Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego. Do badań wytypowano produkty słodzone różnymi kompozycjami środków słodzących, przedstawione w tabeli I.

Szkło i aparatura

1) zestaw do chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej firmy LDC Analytical składający się z następujących elementów: mikropompa Milton Roy, detektor UV Spectro-Monitor 3100, zawór dozujący – Rheodyna 721 – 20 μ l, komputer IBM PC z programem integracyjnym Axxiom 727, drukarka EPSON LX-400, 2) generator ultradźwięków Buchler, 3) kolby miarowe 50 ml, 100 ml, 1000 ml, 4) pipety poj. 1, 2, 5, 10 ml, 5) erlenmajerki, lejki szklane, 6) filtry na strzykawkę Milipore 0,45 μ m.

Tabela I. Produkty owocowo-warzywne wytypowane do oznaczeń ACK i ASP
Fruit and vegetable products selected for ACK and ASP analysis

Lp. Produkt	Mieszianina słodząca	Symbol próbki
1. Sok pomarańczowy	ACK + sorbitol	P-1
2. Sok pomarańczowy	ACK + ASP	P-2
3. Sok przecierowy jabłkowo-dyniowy	ACK + sorbitol	NJD-1
4. Sok przecierowy jabłkowo-dyniowy	ACK + ASP	NJD-2
5. Sok przecierowy selerowo-pomarańczowy	ACK + sorbitol	NSP-1
6. Sok przecierowy selerowo-pomarańczowy	ACK + ASP	NSP-2
7. Sok przecierowy jabłkowo-marchwiowy	ACK + sorbitol	NJM-1
8. Sok przecierowy jabłkowo-marchwiowy	ACK + ASP	NJM-2
9. Sok przecierowy jabłkowo-marchwiowy	ACK + sorbitol	NJM-3
10. Sok przecierowy jabłkowo-marchwiowy	ACK + ASP	NJM-4

ACK – acesulfam K

ASP – aspartam

Odczynniki

1) woda destylowana z nad 0,5 g KMnO_4 cz.d.a. i 5 g NaOH cz.d.a. na 2 l wody, 2) fosforan potasowy I zasadowy cz.d.a., POCH Gliwice, 3) kwas ortofosforowy cz.d.a., POCH Gliwice, 4) acetonitryl do chromatografii, f-my Baker, 5) – wzorzec aspartamu – f-my Nutra Sweet, 6) wzorzec diketopiperazyny – f-my Nutra Sweet, 7) wzorzec acesulfamu K – f-my Hoechst A.G., 8) roztwory Carreza; I. $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3,6 g/100 ml, II. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 7,2 g/100 ml.

Wykonanie oznaczenia

Do kolbki o poj. 50 ml odważono od 3 do 5 gramów próbki soku przecierowego, którą rozcieńczono 20–25 ml wody. Po wymieszaniu zawartości w łaźni ultradźwiękowej, do kolbek dodawano po 1 ml roztworów Carreza I i II, uzupełniano wodą do kreski i sączono przez sączek z bibuły. W tak przygotowanych roztworach wykonywano oznaczenia zawartości aspartamu, diketopiperazyny i acesulfamu K nanosząc 20 μl klarownego przesączu na kolumnę chromatograficzną zabezpieczoną filtrem Millipore 0,45 μm . Przed naniesieniem próbki wykonywano analizy substancji wzorcowych.

Warunki analizy chromatograficznej

Kolumna chromatograficzna – LICHROSORB RP-18 5 μm Merck z przedkolumną, ciecz elucyjna – 0,0125 M bufor fosforanowy o pH 3,5 i acetonitryl zmieszano w stosunku 90:10 lub 88:12, przepływ cieczy elucyjnej – 1,3 ml/min, detektor UV – długość fali 200 nm.

Obliczanie wyników

Zawartość oznaczanych środków słodzących w g/100g próbki obliczano stosując metodę standardu zewnętrznego i wzór:

$$C = \frac{C_{\pi} \times P}{P_{\pi}} \times \frac{V}{N \times 10}$$

gdzie:

C_{π} – stężenie oznaczanego związku w roztworze w mg/ml

p – powierzchnia pików oznaczanego związku w próbce

P_{π} – powierzchnia pliku oznaczanego związku w roztworze wzorcowym

V – końcowa objętość próbki po rozcieńczeniu

N – naważka próbki w gramach pobrana do analizy

Obliczenia zawartości aspartamu i acesulfamu K wykonano za pomocą programu integracyjnego Axxiom 727.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Korzystając z wcześniejszych doświadczeń własnych sprawdzono możliwość rozdziału aspartamu i acesulfamu K w roztworach wzorcowych w warunkach stosowanych dotychczas do rozdziału aspartamu i diketopiperazyny (3) (ciecz elucyjna – bufor fosforanowy o pH 3,5 i acetonitryl zmieszano w stosunku 88:12, przepływ cieczy – 1 ml/min, detektor UV – 200 nm). Uzyskano zadawalające rezultaty rozdziału analizowanych związków – acesulfamu-K, aspartamu i diketopiperazyny.

Tabela II. Wyniki oznaczeń ACK i ASP w roztworach modelowych (g/l)
ACK and ASP contents in model solutions (g/l)

Acesulfam K (ACK)

Roztwór modelowy I 0,092 g/l		Roztwór modelowy II 0,157 g/l	
Przed pasteryzacją	Po pasteryzacji	Przed pasteryzacją	Po pasteryzacji
0,1001	0,0898	0,1550	0,1513
0,1003	0,0965	0,1551	0,1543
0,0933	0,0908	0,1584	0,1530
0,0929	0,0980	0,1581	0,1529
0,0922	0,0903	0,1576	0,1514
–	0,0982	–	0,1513
–	0,0902	–	0,1519
–	0,0916	–	0,1524
–	0,0914	–	0,1514
–	0,0906	–	0,1520
\bar{x} 0,096	0,093	0,157	0,152
SD 0,004	0,003	0,002	0,001
CV 4,3%	3,7%	1,0%	0,6%

Aspartam (ASP)

Roztwór modelowy I 0,092 g/l		Roztwór modelowy II 0,147 g/l	
Przed pasteryzacją	Po pasteryzacji	Przed pasteryzacją	Po pasteryzacji
0,0881	0,0845	0,1517	0,1392
0,0884	0,0801	0,1521	0,1413
0,0932	0,0870	0,1555	0,1412
0,0938	0,0826	0,1559	0,1414
0,0937	0,0868	0,1549	0,1398
–	0,0822	–	0,1392
–	0,0857	–	0,1400
–	0,0867	–	0,1401
–	0,0856	–	0,1423
–	0,0873	–	0,1412
\bar{x} 0,091	0,085	0,157	0,141
SD 0,003	0,002	0,002	0,001
CV 3,2%	2,9%	1,3%	0,7%

W ramach badań na roztworach modelowych wykonano oznaczenia zawartości acesulfamu-K i aspartamu w próbkach niepasteryzowanych oraz po dwa równoległe oznaczenia w próbkach poddanych pasteryzacji. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli II.

Powtarzalność oznaczeń środków wysokosłodzonych w roztworach modelowych wyrażana średnim względnym odchyleniem standardowym wynosiła 0,6 do 4,3%.

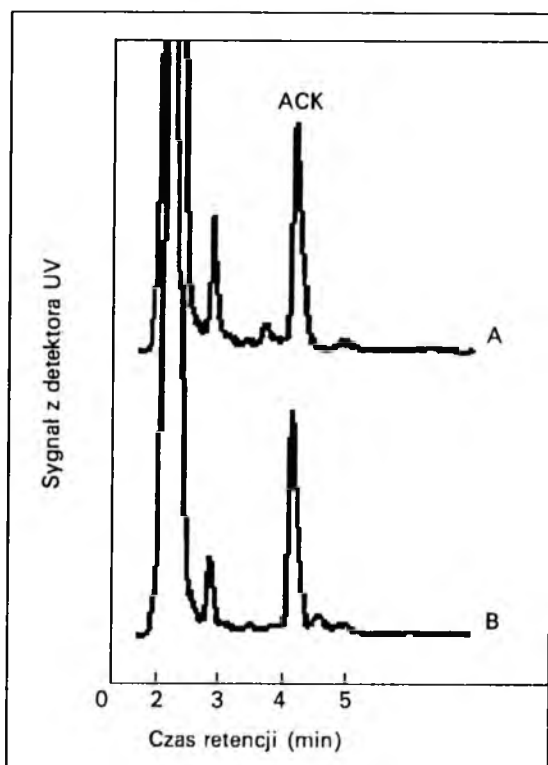
Następnie wykonano oznaczenia zawartości aspartamu i acesulfamu-K w wytypowanych produktach – bezpośrednio po ich przygotowaniu (przed pasteryzacją), po pasteryzacji oraz po trzech i sześciu miesiącach przechowywania gotowych produktów.

Wykonano chromatografy poszczególnych przecierów owocowo-warzywnych – jabłkowego, dyniowego, selerowego i marchwiowego oraz ślepych próbek nie zawierających środków słodzących.

W przypadku roztworów wzorcowych jak również niektórych soków (pomarańczowego i selerowo-pomarańczowego) można było zwiększyć udział acetonitrylu w cieczy elucyjnej (12%) w celu skrócenia czasu analizy. Na chromatografach uzyskanych z tych roztworów nie zaobserwowano bowiem dodatkowych pików substancji interferujących. Dla próbek bardziej złożonych, bogatych w składniki matrycy należało zmniejszyć udział acetonitrylu w cieczy elucyjnej do 10% aby otrzymać dobry rozdział oznaczanych związków i zanieczyszczeń. Wydłużało to niestety czas analizy. Postępowanie takie konieczne było dla próbek zawierających przecier jabłkowy ponieważ piki tła uniemożliwiały ilościowe oznaczenie aspartamu. Wyniki wykonanych oznaczeń przedstawiono w tab. III, a przykładowe chromatografy na ryc. 1, 2.

Tabela III. Wyniki oznaczeń ACK i ASP w sokach przecierowych w g/100 g próbki*)
ACK and ASP contents in nectars (g/100 g)

Symbol próbki	Zawartość w próbce (g/100 g)				
	Dodano	Przed past.	Po past.	Po 3 mies.	Po 6 mies.
Acesulfam K (ACK)					
P-1	0,0090	0,0092	0,0088	0,0088	0,0082
P-2	0,0129	0,0127	0,0120	0,0117	0,0118
NJD-1	0,0073	0,0071	0,0069	0,0069	0,0065
NJD-2	0,0103	0,0101	0,0101	0,0098	0,0095
NSP-1	0,0040	0,0038	0,0039	0,0039	0,0039
NSP-2	0,0057	0,0058	0,0058	0,0051	0,0054
NJM-1	0,0060	0,0057	0,0052	0,0057	0,0055
NJM-2	0,0084	0,0080	0,0078	0,0083	0,0077
NJM-3	0,0052	0,0051	0,0049	0,0053	0,0052
NJM-4	0,0075	0,0073	0,0070	0,0072	0,0071
Aspartam (ASP)					
P-2	0,0128	0,0128	0,0115	0,0095	0,0063
NJD-2	0,0103	0,0108	0,0092	0,0082	0,0056
NSP-2	0,0059	0,0056	0,0057	0,0033	0,0038
NJM-2	0,0084	0,0076	0,0082	0,0052	0,0060
NJM-4	0,0075	0,0072	0,0065	0,0057	0,0051



Ryc. 1. Chromatogramy próbek soku pomarańczowego – P1

a. przed pasteryzacją, b. po 6 miesiącach przechowywania

Fig. 1. Chromatograms of orange juice – P1

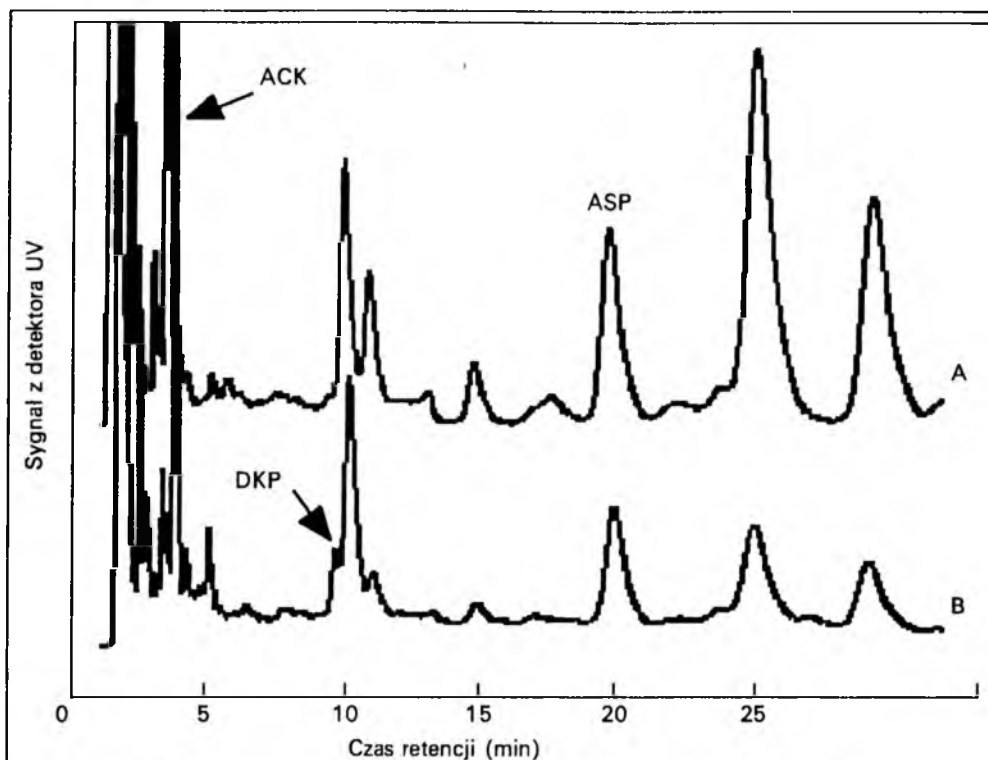
a. before pasteurization, b. after 6 months of storage

Przedstawione wyniki wskazują na dużą stabilność acesulfamu-K w produktach poddanych procesowi pasteryzacji jak również podczas ich przechowywania. W badanych przetworach, po 6 miesiącach ich magazynowania pozostaje powyżej 90% acesulfamu-K. Obserwuje się natomiast stopniowy ubytek zawartości aspartamu, po sześciu miesiącach przechowywania gotowych produktów rozpadowi uległo 30–50% aspartamu.

W próbkach słodzonych aspartamem, po 6 miesiącach przechowywania stwierdzono obecność diketopiperazyny w ilości poniżej 20 mg/kg badanego produktu. W porównaniu z zawartością ADI, równą 7,5 mg/kg masy ciała dziennie [8] (co dla dorosłego człowieka stanowi ok. 500 mg), diketopiperazyna powstająca w badanych produktach na skutek rozpadu aspartamu, nie powinna stanowić zagrożenia zdrowotnego.

W celu sprawdzenia powtarzalności metody oznaczania acesulfamu-K i aspartamu dla soków przecierowych wykonano po kilka równoległych analiz wybranych próbek. Wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Powtarzalność przedstawionej metody oznaczania acesulfamu-K i aspartamu w sokach przecierowych, wyrażona względnym średnim odchyleniem standardowym wynosi od 1,3 do 5,9% i jest porównywalna z danymi uzyskanymi dla roztworów modelowych.



Ryc. 2 Chromatogramy próbek soku przecierowego jabłkowo-dyniowego – NJD-2

a. po pasteryzacji, b. po 6 miesiącach przechowywania

Fig. 2 Chromatograms of apple-pumplern nectar (NJD-2)

a. after pasteurization, b. after 6 months of storage

Tabela IV. Powtarzalność oznaczeń ACK i ASP w próbkach soków przecierowych
Repeatability of ACK and ASP analysis in nectars

Zawartość ACK i ASP w g/100 g						
Acesulfam K (ACK)			Aspartam (ASP)			
Symbol próbki			Symbol próbki			
NJM-4	P-2	NJD-1	NJM-2	P-2	NJD-2	
0,0070	0,0120	0,0102	0,0066	0,0113	0,0091	
0,0070	0,0120	0,0102	0,0066	0,0114	0,0094	
0,0076	0,0120	0,0102	0,0064	0,0117	0,0083	
0,0076	0,0122	0,0100	0,0069	0,0118	0,0097	
–	0,0122	0,0099	–	–	0,0085	
–	0,0121	0,0100	–	–	0,0092	
\bar{x}	0,0073	0,0120	0,0101	0,0066	0,0115	0,0090
SD	0,0003	0,0002	0,0001	0,0002	0,0002	0,0005
CV	4,7%	1,6%	1,3%	3,1%	2,1%	5,9%

\bar{x} – wartość średnia; SD – odchylenie standardowe; CV – względne odchylenie standardowe (współczynnik zmienności)

Odzysk acesulfamu K i aspartamu w próbkach soków przecierowych sprawdzono dodając określone ilości oznaczanych związków zarówno do próbek zerowych tzn. nie zawierających syntetycznych środków słodzących, jak również do próbek słodzonych tymi preparatami.

Tabela V. Odzysk ACK i ASP w próbkach soków przecierowych
Recovery of ACK and ASP added to nectars

Próbka	Zawartość początkowa (g/100 g)	Dodano (g/100 g)	Średni odzysk %*
Acesulfam K (ACK)			
P	0	0,0100	96,0
P	0	0,0124	97,0
NJD-2	0,0100	0,0052	99,9
NJD-1	0,0065	0,0031	101,8
Aspartam (ASP)			
P	0	0,0129	97,1
NJD-2	0,0088	0,0049	95,9
NSP-1	0	0,0051	98,3

* Wynik stanowi średnia z trzech równoległych oznaczeń

Średni odzysk acesulfamu K i aspartamu w badanych produktach, wyznaczony z trzech równoległych oznaczeń wynosi powyżej 95% (tab. V) i jest porównywalny z danymi literaturowymi [4, 6, 10, 11].

WNIOSKI

Przedstawiona metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) umożliwia identyfikację jakościową oraz ilościowe oznaczanie zawartości acesulfamu K i aspartamu w niskokalorycznych przetworach owocowo-warzywnych i może być stosowana w rutynowej analizie ww. środków słodzących.

K. Szymczyk, L. Czerwiecki

HPLC DETERMINATION OF ASPARTAME AND ACESULFAM-K PROCESSED FRUIT PRODUCTS

Summary

A liquid chromatographic method for the determination of the intense sweeteners – aspartame and acesulfam-K in fruit and vegetable nectars was described. Samples were extracted with water, then clarified with Carrez solutions. An aliquot of the extract was analyzed on C-18 reverse-phase column with UV detection. Mean recoveries ranged from 95,9 to 101,8%. The method is suitable for routine determinations of both sweeteners.

PIŚMIENICTWO

1. *Askar A., El-Zoghbi M.*: Relative sweetness and synergism of fructose or xylicol with aspartame or acesulfam-K. *Fluss. Obst.* 1991, 6, 298-300. – 2. *Czerwiecki L., Delong A.*: Metoda oznaczania aspartamu i sacharyny w wybranych przetworach owocowych. *Prace Inst. i Lab. Bad. Przem. Spoż.* 1991, 43, 7. – 3. *Czerwiecki L., Szymczyk K.*: Równoczesne oznaczanie aspartamu i diketopiperazyny w napojach orzeźwiających za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. *Prace Inst. i Lab. Przem. Spoż.* 1993, 48, 31-42. – 4. *Hagenauer-Hener U., Frank C., Hener U.*: Bestimmung von Aspartam, Acesulfam K, Saccharin, Coffein, Sorbinsäure und Benzoesäure in Lebensmitteln mittels HPLC. *Deutsche Lebens.-Rund* 1990, 88, 11, 348-351. – 5. *Hannisdal A.*: Analysis of acesulfam K, saccharin and preservatives in beverages and jams by HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1991, 194, 517-519. – 6. *Lawrence J.F., Charbonneau C.F.*: Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *J. Ass. Off. Anal. Chem.* 1988, 71, 934. – 7. *Mijnsbergen C.W., van Hamersveld I.C.M., Arnold M.C.E.*: HPLC-Bestimmung von K-Acesulfam in Lebensmitteln und nicht-alkoholischen Getränken. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1992, 194, 94. – 8. *Nikonorow M., Urbanek-Karłowska B.*: Toksykologia żywności. *PZWL*, 1987, 239. – 9. *Neue Zusatzstoff – Zulassungs-verordnung für SuB-stoffe.* *ZFL*, 1990, 41, 10, 624. – 10. *Prodoliet J., Bruehlhart M.*: „Determination of acesulfam K in foods. *JAOAC* 1993, 76, 2, 268-272.

11. *Prodoliet J., Bruehlhart M.*: Determination of aspartame and its major decomposition products in foods. *JAOAC* 1993, 76, 2, 275-282. – 12. *Stamp J.A., Labuza T.P.*: An ion-pair performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *J. Food Science*, 1989, 54, 1043.

Dn. 27.01.1995 r.

02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36