

## Metódy na analýzu aspartamu

T. A. VERSTAPPEN—S. M. S. MILTENBURG

Súhrn. Tento článok sa zaoberá metódami, ktoré sa najbežnejšie používajú na analýzu intenzívneho sladidla aspartamu: titrácia, UV spektrofotometria (s derivatizáciou alebo bez nej), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (s reverznou fázou a reverznou fázou iónových párov) a tenkovrstvová chromatografia. Výber metódy závisí od takých faktorov, ako je dostupnosť prístrojov, produkt, ktorý sa má analyzovať a požadovaná presnosť analýzy.

Aspartam je intenzívne sladidlo, ktoré je asi 200-krát sladšie ako cukor. Preto na osladenie výrobku je potrebné iba veľmi malé množstvo aspartamu, takže jeho vplyv na celkový energetický obsah potravín je zanedbateľný. Pre túto vlastnosť, ako aj pre svoju vynikajúcu chuť a dobrý vzhľad je aspartam veľmi populárny.

Keďže v potravinách je zvyčajne prítomné iba malé množstvo aspartamu, na jeho stanovenie sú potrebné citlivé metódy. Najcitlivejšou dostupnou metódou je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ale nie každý podnik má pre ňu potrebné prístrojové vybavenie. Napriek tomu stanovenie možno urobiť analytickými metódami, ktoré, hoci sú menej špecifické, sú vhodné na všetky praktické účely a vyžadujú menej náročné prístrojové vybavenie.

Okruh potravín, do ktorých sa aplikuje aspartam, stále rastie. Analýza aspartamu teda musí byť možná nielen v produktoch, ktoré majú relatívne jednoduché zloženie, ako napr. nealkoholické nápoje, ale aj v oveľa zložitejších výrobkoch, ako sú napr. ovocné jogurty alebo žuvačky. Preto sú potrebné špecifickejšie analytické metódy.

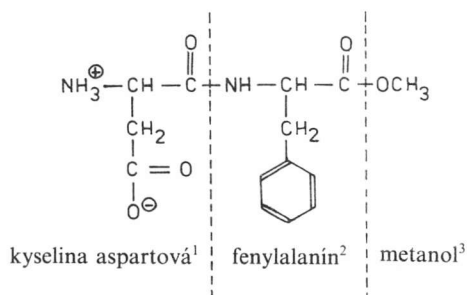
---

T. A. Verstappen, DSM Research, Gellen, The Netherlands.

S. M. S. Miltenburg, Holland Sweetener Company, Maastricht, The Netherlands.

## 1. Analýza aspartamu a jeho rozkladné produkty

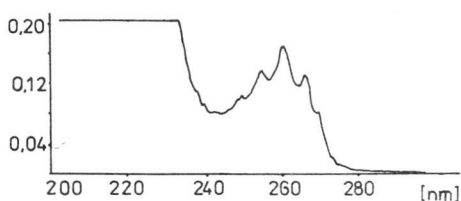
Aspartam má dve stavebné zložky — kyselinu L-asparágovú a metylester L-alanínu. Výsledkom enzymatickej derivatizácie týchto dvoch aminokyselín je podľa postupu fy Holland Sweetener Company dipeptid *N*-L- $\alpha$ -aspartyl-L-fenylalanínmetylester, t. j. aspartam (obr. 1).



Obr. 1. Štruktúrny vzorec aspartamu.

Fig. 1. Structural formula of aspartame. (<sup>1</sup> Aspartic acid; <sup>2</sup> Phenylalanine; <sup>3</sup> Methanol.)

Absorpčné maximum aspartamu v UV oblasti je okolo 256 nm (obr. 2), ale absorpcia UV žiarenia v oblasti kratších vlnových dĺžok je oveľa vyššia. Preto sa UV merania často robia pri vlnovej dĺžke 210 nm. Navyše molekula aspartamu má amfoterný charakter, takže aspartam sa dá stanoviť titráciou karboxylovej skupiny aj aminoskupiny.

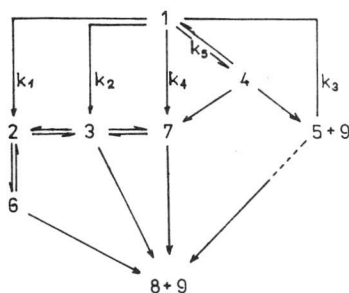


Obr. 2. Absorpčné spektrum aspartamu; absorpčné maximum pri 256 nm.

Fig. 2. Absorption spectrum of aspartame; absorption maximum at 256 nm.

Aspartam sa časom rozkladá, rýchlosť rozkladu a typ rozkladných produktov závisia od teploty, pH a obsahu vlhkosti látky, v ktorej je aspartam prítomný. Tento rozkladný proces znižuje sladkosť, pretože sladká chuť je spojená iba so štruktúrou  $\alpha$ -aspartamu a nesúvisí s nijakými inými rozkladnými produktmi.

Pre riadnu kontrolu kvality potravín je dôležité analyzovať aj tieto rozkladné produkty. Na obr. 3 sú niektoré spôsoby rozkladu aspartamu.



Obr. 3. Spôsob rozkladu aspartamu. 1 — L- $\alpha$ -aspartyl-L-fenylalanín-metylester (APM), 2 — 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazín-kyselina octová (DKP), 3 — L- $\alpha$ -aspartyl-L-fenylalanín ( $\alpha$ AP), 4 — L- $\beta$ -aspartyl-L-fenylalanín-metylester ( $\beta$ APM), 5 — L-fenylalanín-metylester (Phe-M), 6 — L-fenylalanín-L-kyselina asparágová (PA), 7 — L- $\beta$ -aspartyl-L-fenylalanín ( $\beta$ AP), 8 — L-fenylalanín (Phe), 9 — L-kyselina asparágová (Asp). Racemizácia uvedených produktov je tiež možná.  
Fig. 3. Aspartame decomposition routes. 1 — L- $\alpha$ -aspartyl-L-phenylalanine-methyl ester (APM), 2 — 5-benzyl-3,6-dioxo-2-piperazine-acetic acid (DKP), 3 — L- $\alpha$ -aspartyl-L-phenylalanine ( $\alpha$ AP), 4 — L- $\beta$ -aspartyl-L-phenylalanine-methyl ester ( $\beta$ APM), 5 — L-phenylalanine-methyl ester (Phe-M), 6 — L-phenylalanine-L-aspartic acid (PA), 7 — L- $\beta$ -aspartyl-L-phenylalanine ( $\beta$ AP), 8 — L-phenylalanine (Phe), 9 — L-aspartic acid (Asp). Racemization of the above products is also possible.

V ďalšej časti článku sú opísané najbežnejšie metódy na analýzu aspartamu a jeho rozkladných produktov. Rozličné metódy stanovenia sa odlišujú presnosťou a špecifickosťou.

## 2. Titrácia aspartamu

Aspartam sa môže titrovať jednoduchým spôsobom. Na titrácii sa zúčastňujú obidve skupiny — karboxylová ( $-\text{COOH}$ ) a aminoskupina ( $-\text{NH}_2$ ). Nevýhodou oboch titrácií je, že nie sú špecifické, t. j. ostatné komponenty kyslej alebo zásaditej povahy môžu ovplyvniť titráciu. Preto sa titrácia používa prakticky iba na analýzu čistých roztokov aspartamu vo vode.

Najznámejšia je metóda titrácie s metoxidom lítnym, opísaná vo Food Chemical Codex [1]. Na titráciu karboxylovej skupiny aspartamu sa používa silná zásada v dimetylformamidovom prostredí až do zmeny farby indikátora — tymolovej modrej TS. Interferenciu zapríčiňujú rozkladné produkty aspartamu, AP a DKP, ktoré sú takmer vždy prítomné (obr. 3). Obidva obsahujú aj

karboxylovú skupinu, ktorá sa ľahko titruje a tak sa s ňou pri stanovení počíta ako s aspartamom.

Metóda použitá podľa HSC/DSM [2] je založená na titracii aminoskupiny aspartamu pomocou kyseliny chloristej. Pri tejto metóde sa rozkladné produkty s aminoskupinou (ako napr. AP) zahŕňajú do stanovenia a výpočtu aspartamu; DKP sa nezahŕňa, keďže neobsahuje voľné aminoskupiny.

Titrácia kyselinou chloristou prebieha takto:

- 2.1 Presne sa naváži množstvo vzorky, ktorá obsahuje 150—200 mg aspartamu, a prenesie sa do titračnej nádoby.
- 2.2 Pridá sa 5 ml kyseliny mravčej a rozpustí sa.
- 2.3 Pridá sa 80 ml ľadovej kyseliny octovej.
- 2.4 Do roztoku sa vloží sklená elektróda a referenčná elektróda. Referenčná elektróda sa naplní nasýteným roztokom chloristanu lítneho v ľadovej kyseline octovej.
- 2.5 Potenciometricky sa titruje 0,1 N kyselinou chloristou. urobí sa záznam titračnej krivky a výpočet spotreby 0,1 N kyseliny chloristej.
- 2.6 Vykoná sa slepý pokus s reagentmi.
- 2.7 Vypočíta sa obsah aspartamu v hmotnostných percentách podľa vzorca:

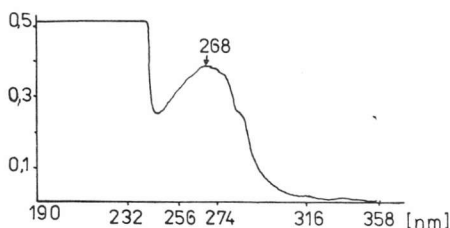
$$\frac{(\text{ml kyseliny chloristej na vzorku} - \text{slepé stanovenie}) \times 294,3 \times \text{titer}}{\text{kyseliny chloristej} \times 100} \cdot \text{návažok vzorky v mg}$$

### 3. Spektrofotometrická analýza aspartamu

3a. *UV spektrofotometria pri 256 nm.* Pri spektrofotometrickej analýze roztokov čistého aspartamu vo vode sa spektrofotometer nastaví na absorpčné maximum aspartamu (256 nm). Zmeria sa absorbancia niekoľkých kalibračných roztokov so známou koncentráciou aspartamu a stanoví sa rozsah linearity merania. Vzorka, ktorá sa má analyzovať, rozpustí sa tak, že koncentrácia aspartamu je v medziach rozsahu lineárneho merania. Presné množstvo prítomného aspartamu sa môže potom jednoducho určiť.

Táto metóda nie je špecifická, pri vlnovej dĺžke 256 nm rozkladné produkty DKP a AP takisto vykazujú UV absorpciu. Napr. v nealkoholických nápojoch sa aspartam nedá presne stanoviť, pretože prítomné farbivá, ochucovadlá a konzervačné činidlá často absorbujú pri tejto vlnovej dĺžke, takže znemožňujú presné stanovenie.

Z tohto hľadiska je rušivá prítomnosť sacharínu. Hoci toto sladidlo má absorpčné maximum pri 268 nm, absorbuje aj pri 256 nm (obr. 4).



Obr. 4. Absorpčné spektrum sacharínu; absorpčné maximum pri 268 nm, taktiež UV absorpcia pri 256 nm.

Fig. 4. Absorption spectrum of saccharin; absorption maximum at 268 nm, but also UV absorption at 256 nm.

3b. *UV Spektrofotometria s derivatizáciou pri 330 nm.* Za prítomnosti ďalších rušivých komponentov, napr. v nealkoholických nápojoch, aspartam sa dá niekedy stanoviť derivatizáciou aminoskupiny aspartamu pomocou dialdehydu ortoftalového (OPA) a merkaptobetanolu [3]. Derivatizáciou sa získa zlúčenina, ktorá má UV absorpčné maximum pri 330 nm.

Pri tejto vlnovej dĺžke mnohé zložky nealkoholických nápojov nevykazujú nijakú absorpciu. Zložka s aminoskupinou (ako AP) je však zahrnutá do stanovenia, takže metóda sa môže použiť iba na stanovenie celkom čerstvých výrobkov.

Reagenty: dialdehyd ortoftalový (OPA) v 1,0 M tlmivom roztoku borátu draselného, aspartam, dihydrogénfosforečnan sodný, kyselina fosforečná (1 M), metanol a destilovaná voda.

Prístroje: spektrofotometer, 3 ml kvartérnej aminosovej extrakčnej kolóny SPE, výrobca J.T. Baker Chemical Co. (art. No. 7091-03).

#### Postup:

3b.1 — Rozpustíme 1 g OPA, 5 ml metanolu a 3 ml merkaptobetanolu a doplníme do 250 ml 1 M tlmivým roztokom kyseliny boritej, predtým upravenej pridaním KOH na pH 10,0. Pripravuje sa 24 hodín pred použitím.

3b.2 — Príprava fosforečnanového tlmivého roztoku:

1,4 g dihydrogénfosforečnanu sodného dáme do 1 l banky a pridáme 800 ml vody. Miešame až do úplného rozpustenia a pH upravíme na 3,0 pomocou kyseliny fosforečnej (1 M).

3b.3 — Príprava kalibračnej krivky na merania medzi 100 a 600 mg/kg: presné

návažky 10, 20, 30, 40, 50 a 60 mg aspartamu dáme do 100 ml baniek, rozpustíme vo fosforečnanovom tlmivom roztoku a doplníme po značku fosforečnanovým tlmivým roztokom. Prenesieme 1,00 ml z každého roztoku do skúmavky a pridáme 6 ml vody. Ďalej postupujeme ako v bode 3b.6.

- 3b.4 — Príprava vzorky: odplyníme v ultrazvukovom kúpeli. Prenesieme 1,00 ml nápoja do skúmavky a pridáme 6,00 ml vody. Rovnako pripravíme zriedený tlmivý roztok alebo, najradšej, slepú vzorku bez aspartamu. Ďalší postup je ako v bode 3b.6.
- 3b.5 — Príprava SPE kolóny: kolónu prepláchneme 3 ml etanolu, podobne potom 3 ml fosforečnanového tlmivého roztoku.
- 3b.6 — Analýza: zmiešame obsahy skúmaviek na vírivej miešačke a 3 ml z každej skúmavky nanesieme na predbežne upravenú kolónu. Tým sa odstráni z kolóny fosforečnanový tlmivý roztok. Znovu odoberieme 3 ml z každej skúmavky, necháme ich prejsť SPE kolónou a eluent zachytíme.
- 3b.7 — Derivatizujeme tak, že vnesieme 2,00 ml eluentu do skúmavky a pridáme 0,250 ml reagentu OPA. Dobre premiešame na vírivej miešačke. Asi o 25—35 min po pridaní OPA sa dá absorpcia merať pri 330 nm oproti slepému pokusu. Derivát vzniká asi v priebehu 25 min a potom sa pri normálnej teplote pomaly rozkladá. Preto je dôležité, aby sa vzorky i referenčné vzorky použité na kalibráciu analyzovali v rovnakom časovom intervale.
- 3b.8 — Kvantifikácia: zostavíme kalibračnú krivku (3b.3) funkčnej závislosti absorbancie od koncentrácie aspartamu. krivka má sklon približne 0,002 absorpčnej jednotky na  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  aspartamu, odchýlky bodov sú menšie ako 5 %. Koncentrácia aspartamu sa zistí tak, že absorbancia vzoriek sa porovná s hodnotami kalibračnej krivky a odčíta sa koncentrácia aspartamu.

V opísanej metóde sa môže merkaptoetanol nahradiť kyselinou 3-merkaptopropiónovou [4]. To urýchli priebeh reakcie (skončí sa v priebehu 5 min), a derivatizovaný produkt v reakčnej zmesi bude stabilnejší (aspoň 90 min).

#### 4. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Táto metóda sa nedá vždy použiť, pretože náklady na potrebnú techniku sú relatívne vysoké. Analýzou HPLC sa dajú získať veľmi špecifické a veľmi presné výsledky. HSC/DSM vyvinuli dve HPLC metódy [2]. Jedna je založená na kvapalinovej chromatografii s reverznými fázami (RPLC) (4e), druhá na kvapalinovej chromatografii iónového páru s reverznými fázami (RC ion pair LC) (4b).

Pri metóde RPLC sa zložky oddelia na základe rozdielnej polarity. Ako nepolárna stacionárna fáza sa používajú silikagély modifikované oktylovými alebo oktadecylovými skupinami. Veľkosť častíc je 3, 5 alebo 10  $\mu\text{m}$ . Polárnu mobilnú fázu predstavuje zmes vodného tlmivého roztoku a organického rozpúšťadla, ako je metanol a acetonitril.

Pri metóde RC ion pair LC sa ionogénne zložky oddeľujú trochu odlišným spôsobom. K mobilnej fáze sa pridajú zlúčeniny tvoriace iónové páry, ktoré sú schopné separovať kyseliny a zásady, pretože sú fyzikálne naviazané na povrch modifikovaného silikagélu. RP metódou sa izoluje  $\alpha$ -aspartam z rozličných rozkladných produktov, okrem  $\beta$ -aspartamu. Ostatné komponenty, ako sacharín, kofeín a benzoát, sa tiež dajú separovať touto metódou. Metódou iónového páru s reverznou fázou sa oddeľuje  $\alpha$ -aspartam a rôzne rozkladné produkty vrátane  $\beta$ -aspartamu. Sacharín a kofeín sa nedajú stanoviť touto metódou, pretože sacharín prechádza kolónou bez zadržania a kofeín sa eluuje spolu s DKP.

4a. *Príprava vzorky.* Vzorky, ktoré sa majú analyzovať metódou HPLC, musia byť upravené tak, aby sa získal aspartam v roztoku. Úprava bude rozličná, v závislosti od charakteru analyzovanej vzorky.

4b. *Príprava vo vode rozpustných vzoriek.* Tu sú zahrnuté nealkoholické nápoje, ovocné šťavy, osviežujúce nápoje, ovocné prípravky, pudinky, zmrzliny, čokoládové mlieko, likéry, cukríky, džemy, jogurty a jogurtové nápoje.

4b.1 — Vzorky dobre zhomogenizovať.

4b.2 — Navážime také množstvo vzorky do 100 ml banky, aby obsahovala 1—7 mg aspartamu.

4b.3 — Pridáme eluent (pozri 4e) a homogenizujeme 15 min.

4b.4 — Doplníme po značku eluentom a zamiešame.

4b.5 — Ak treba, prefiltrujeme cez 0,45  $\mu\text{m}$  filter.

4c. *Príprava vzoriek obsahujúcich tuk.* Do tejto skupiny patria keksy, koláče a čokoláda.

4c.1 — Vzorky dobre zhomogenizujeme.

4c.2 — Navážime také množstvo vzorky do odstredivkovej skúmavky, aby obsahovala 1—7 mg aspartamu.

4c.3 — Pridáme 10 ml fosforečnanového tlmivého roztoku (0,05 M, pH 3) a 25 ml éteru.

4c.4 — Do odstredivkovej skúmavky vložíme magnetické miešadlo a intenzívne miešame 15 min.

4c.5 — Odcentrifugujeme a oddelíme éterovú vrstvu.

4c.6 — Extrahujeme ešte raz, opäť použijeme 25 ml éteru.

- 4c.7 — Éter dôkladne odstránime a vrstvu fosforečnanového tlmivého roztoku kvantitatívne preniesieme pomocou eluentu do 100 ml banky.  
4c.8 — Doplníme po značku a premiešame.  
4c.9 — Roztok prefiltrujeme cez 0,45  $\mu\text{m}$  filter.

4d. *Príprava vzoriek žuvačky.*

- 4d.1 — Do 100 ml Erlenmeyerovej banky navážime také množstvo žuvačky, aby sme získali 1—7 mg aspartamu.  
4d.2 — Pridáme 25 ml toluénu a 25 ml tlmivého roztoku fosforečnanu sodného (0,05 M, pH 3,0).  
4d.3 — Do Erlenmeyerovej banky vložíme magnetické miešadlo a veľmi intenzívne miešame 1 h (pri vysokých otáčkach).  
4d.4 — Obsah preniesieme do odstredivkovej skúmavky a odstredíme 10 min.  
4d.5 — Dôkladne odstránime vrstvu toluénu a fosforečnanový tlmivý roztok kvantitatívne preniesieme s eluentom do 100 ml banky.  
4d.6 — Doplníme po značku a premiešame.  
4d.7 — Roztok prefiltrujeme cez 0,45  $\mu\text{m}$  filter.

4e. *Analýza aspartamu kvapalinovou chromatografiou s reverznými fázami.*

Činidlá: tlmivý roztok fosforečnanu sodného, pH 3,0, 0,05 M. Eluent — zmiešame 200 ml metanolu s 800 ml tlmivého roztoku fosforečnanu sodného, roztok prefiltrujeme a odplyníme.  $\alpha$ -Aspartam — obsah  $\alpha$ -aspartamu musí byť korigovaný na prítomné nečistoty, ako je voda, AP a DKP. 3-Benzyl-6-karboxymetyl-2-5-diketopiperazín (DKP) > > 99 hmot. % L- $\alpha$ -aspartyl-L-fenylalanín (AP) (obsah je upravený vzhľadom na DKP a vodu).

Prístroje: kvapalinový chromatograf špecifikovaný:

- kolóna: Nukleosil C 18; 250  $\times$  4 mm, priemerná veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$ ,
- teplota: izbová teplota,
- prietoková rýchlosť: 1 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,
- pokles tlaku: približne 200 barov,
- nástrek: 40  $\mu\text{l}$ .

Detekcia: HPLC/UV detektor so šírkou spektrálneho pásu 8 mm, vhodný na meranie pri vlnovej dĺžke 210 nm a vybavený 8 ml kyvetou a hrúbkou priepustnej vrstvy 10 mm.

Integrácia: Lab. data system pre automatické spracovanie chromatogramov.

Kalibrácia: Kalibrácia sa robí v pravidelných intervaloch tak, aby sa eliminovali akékoľvek zmeny, ktoré by mohli ovplyvniť výsledok, napr. teplota, nastavenie prietokových rýchlostí spektrofotometra.



## Postup:

- 4e.1 — Pripravíme kalibračné roztoky s aspartamom (ak je potrebné, kalibrujú sa iné zložky) presným navážením množstva v intervale 1—7 mg (mikroanalytické váhy) do 100 ml banky.
- 4e.2 — Rozpustíme v eluente a doplníme.
- 4e.3 — Nastrekneme 40  $\mu$ l do kolóny, eluujeme a urobíme chromatografický záznam.
- 4e.4 — Zmeriame plochu píku a vypočítame kalibračný faktor ( $f_c$ ) pomocou vzťahu

$$f_c = m_c / A_c,$$

kde  $m_c$  sú mg naváženeho aspartamu,  $A_c$  je plocha píku v kalibrácii.

- 4e.5 — Nastrekneme 40  $\mu$ l upravenej vzorky do kolóny a zaznamenáme priebeh chromatogramu.

- 4e.6 — Zmeriame plochu píku a vypočítame obsah pomocou vzorca

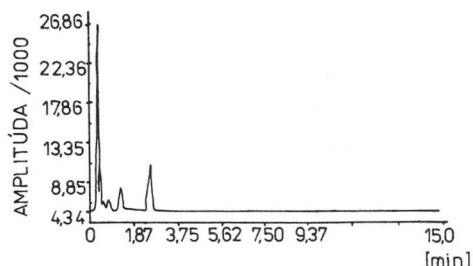
$$f_c A_{cs} / a_{cs} 10 = \text{hm. \% aspartamu},$$

kde  $f_c$  je kalibračný faktor aspartamu,  $A_{cs}$  plocha píku aspartamu v kalibrácii,  $a_{cs}$  množstvo naváženej vzorky v gramoch.

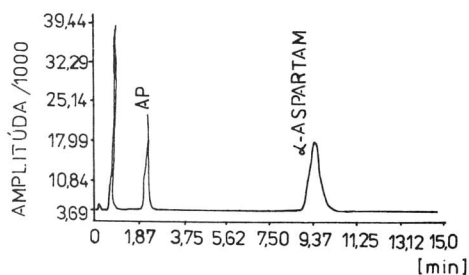
Aby sa vylúčil rušivý vplyv zložiek absorbujúcich v UV oblasti, zvyčajne sa zaznamenáva aj spektrum podobných produktov bez aspartamu. V mnohých prípadoch je totožný výrobok obsahujúci cukor.

Na obr. 5 je príklad spektra Marhuľovej brandy s cukrom.

Na obr. 6 je spektrum kalibračnej zmesi aspartamu DKP a AP používanej na analýzu Marhuľovej brandy (obr. 7) obsahujúcej aspartam.

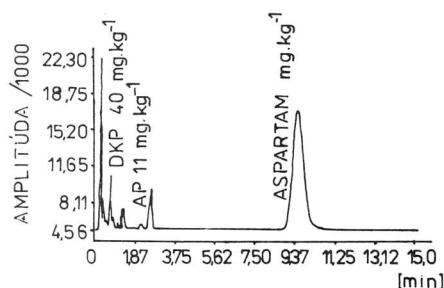


Obr. 5. Chromatografia reverznej fázy: chromatogram (210 nm) Marhuľovej brandy s cukrom.  
Fig. 5. Reverse phase chromatography: chromatogram (210 nm) of Apricot Brandy with sugar.



Obr. 6. Chromatografia reverznej fázy: chromatogram (210 nm) kalibračnej zmesi  $\alpha$ -aspartamu, DKP a AP.

Fig. 6. Reverse phase chromatography: chromatogram (210 nm) of a calibration mixture of  $\alpha$ -aspartame, DKP and AP.



Obr. 7. Chromatografia reverznej fázy: chromatogram (210 nm) Marhuľovej brandy s aspartamom.

Fig. 7. Reverse phase chromatography: chromatogram (210 nm) of Apricot Brandy with aspartame.

4f. *Analýza aspartamu kvapalinovou chromatografiou iónového páru s reverznými fázami.* Postup tejto metódy sa v mnohom zhoduje s opísanou RP metódou. Rozdiely sú tieto:

Činidlá: Eluent — nadávkujeme 1,882 g sodnej soli kyselina 1-hexánsulfónovej a 0,45 g hydrogénfosforečnanu draselného do 1 l banky a rozpustíme v 750 ml vody. Upravíme pH na 3,0 pridaním 0,1 M kyseliny fosforečnej. Potom pridáme 100 ml acetonitrilu, doplníme po značku a premiešame.

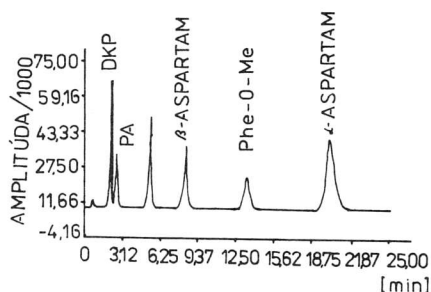
Kolóna — Nukleosil C 18, 100 × 4 mm, priemerná veľkosť častíc 5  $\mu$ m.

Prietoková rýchlosť — 1,5 ml · min<sup>-1</sup>.

Pokles tlaku — 140 barov.

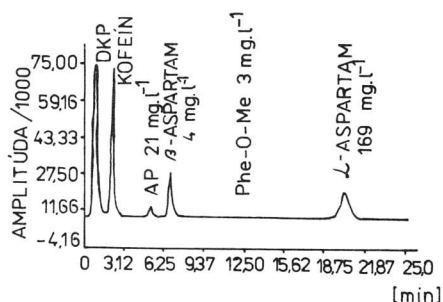
Ešte pred nástrekom sa nová kolóna musí naplniť činidlom tvoriacim iónové páry, preto prelejeme kolónou asi 500 ml eluentu. Ďalej postupujeme ako v bode 4e.

Príklad analýzy nápoja typu Cola podľa tejto metódy je na obr. 8 a 9, ktoré ukazujú chromatogramy kalibračnej zmesi a vzorky.



Obr. 8. Chromatografia iónového páru: chromatogram (210 nm) kalibračnej zmesi  $\alpha$ -aspartamu, DKP, AP,  $\beta$ -aspartamu, PA a Phe-O-Me.

Fig. 8. Ion pair chromatography: chromatogram (210 nm) of a calibration mixture of  $\alpha$ -aspartame, DKP, AP,  $\beta$ -aspartame, PA and Phe-O-Me.



Obr. 9. Chromatografia iónového páru: chromatogram (210 nm) vzorky koly. Vrcholy DKP a kofeínu sú na rovnakej úrovni,  $\beta$ -aspartam sa odlišuje.

Fig. 9. Ion pair chromatography: chromatogram (210 nm) of a cola sample. The DKP and caffeine peaks coincide,  $\beta$ -aspartame is separated. (<sup>1</sup> Force normalized.)

4g. *Tenkovrstvová chromatografia (TLC)*. Pri tenkovrstvovej chromatografii (2, 5, 6) sa zložky separujú tak, že sa vzorka nanesie na TLC platňu a tá sa potom vloží do nádoby s eluentom. Separované zložky sa postupne vizualizujú tak, že sa TLC platňa postrieka chlórnanom, vysuší, a potom sa postrieka detekčným reagentom.

Vytvorené škvrny vzoriek sa vizuálne porovnajú so vzorkami kalibračných roztokov, aby sa mohli stanoviť koncentrácie.

TLC je relatívne jednoduchá, ale menej presná analytická metóda.

Činidlá: Eluent — zmiešame 300 ml butanolu so 100 ml kyseliny octovej (> 99 hmot. %) a 100 ml vody. Chlórnan draselný: 1 hmot. % vo vode.

Detekčné činidlo: nadávkujeme 1 g *o*-toluidínu, 30 ml kyseliny octovej (> 99 hmot. %) a 5 g jodidu draselného do 1 l vody a miešame až do úplného rozpustenia. Takto pripravený roztok skladujeme na tmavom mieste.

$\alpha$ -aspartam, DKP a AP: pozri 4e.

TLC platňa — silikágel 60 F 254, hrúbka vrstvy je 0,25 mm.

Prístroje: uzatvárateľná kyveta na eluent a TLC platňu. Sušiareň s odsávaním. Nádobka so sprejom.

### Postup:

- 4g.1 — Pripravíme si kalibračné roztoky s  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$  aspartamu, DKP a AP a postupne z nich aplikujeme 1, 2, 3, 4 a 5  $\mu\text{l}$  na štart na TLC platni.
- 4g.2 — Rozpustíme vzorku tak, aby sme získali roztok s koncentráciou asi  $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$  a aplikujeme 3 a 4  $\mu\text{l}$  tohto roztoku na platňu.
- 4g.3 — Vložíme platňu do kyvety, ktorá obsahuje asi 5 mm eluentu.
- 4g.4 — Necháme vyvíjať platňu do výšky 10—12 cm, vyberieme ju z kyvety a presne označíme čelo eluentu.
- 4g.5 — Platňu TLC sušíme 5 min pri  $100^\circ\text{C}$ .
- 4g.6 — Po ochladení na izbovú teplotu striekame na ňu sprejom chlórnan sodný dovtedy, kým nie je platňa vlhká.
- 4g.7 — Opäť platňu sušíme 5 min pri  $100^\circ\text{C}$ .
- 4g.8 — Znovu platňu postriekame tak, aby bola vlhká a pokrytá rovnomernou vrstvou detekčného činidla.
- 4g.9 — Vizuálne porovnáme purpurové škvrny, ktoré vytvorili vzorky a kalibračné roztoky, a stanovíme obsah aspartamu, AP a DKP.  
Hodnoty  $R_f$  pre rôzne komponenty sa dajú vypočítať podľa vzorca

$$R_{f_i} = S_i / E_i,$$

kde  $R_{f_i}$  je hodnota škvrny  $i$ ,  $S_i$  vzdialenosť medzi bodom štartu a škvrnou  $i$ ,  $E_i$  vzdialenosť medzi bodom štartu a čelom eluentu.

Hodnoty  $R_f$ : AP = 0,22, DKP = 0,55, aspartam = 0,38.

## 5. Ostatné analytické metódy

Pomocou analytických metód opísaných v predchádzajúcich kapitolách sa dá obsah aspartamu stanoviť v mnohých potravinách. Sú to metódy najbežnejšie používané pre tento prípad.

V literatúre sú však opísané aj menej známe metódy, ktoré môžu byť vhodné na určité použitie.

Napr. a) analýza využívajúca kapilárnu izotachofórezu [7],

b) HPLC metódy s predkolónovou alebo pokolónovou derivatizáciou aspartamu s následnou fluorometrickou detekciou [8] a

c) metóda využívajúca selektívnu elektródu s chemicky imobilizovaným enzýmom (L-aspartáza), ktorý vlastne umožní priebeh analýzy [9].

## Literatúra

1. Food Chemical Codex. 4. ed. Washington, National Academy Press 1981.
2. Internal DSM analytical method nepublikovaná
3. ROTH, M., Anal. Chem., 43, 1971, s. 880.
4. KULERA, P.—UMAGAT, H., J. Chrom., 255, 1983, s. 563.
5. DANIELS, D. H.—JOE, F. L. Jr.—WARNER, C. R.—FATIO, T., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1984, s. 513.
6. CONKLIN, A. R., J. Chem. Educ., 64, 1987, s. 1065.
7. KVASNICKA, F., J. Chromatogr., 390, 1987, s. 237.
8. CROSS, R.—CUNICO, B., Liq. Chromatogr., 2, 1984, s. 678.
9. GUILBAULT, G. G.—LUBRANO, G. J.—KAUFMANN, J. M.—PATRIARCHE, G. J., Analyt. Chim. Acta, 206, 1988, s. 369.

Do redakcie došlo 16.4. 1990

## Методы для анализа аспартама

### Резюме

В статье говорится о методах, которые чаще всего применяются при анализе интенсивного подсластителя аспартама, это: титрование, УВ спектрофотометрия (с или без дериватизации), высокоэффективная жидкостная хроматография (с реверсивной фазой и на реверсивной фазе ионной парой) и тонкослойная хроматография. Выбор метода зависит от таких факторов как доступность приборов, вид продукта, который надо анализировать и требуемая точность анализа.

## **Methods for the analysis of aspartame**

### **Summary**

This article discusses the methods that are most commonly use to analyse the intense sweetener aspartame: titration, UV spectrophotometry (with and without derivatization), high-performance liquid chromatography (reverse phase and reverse phase ion pair) and thin-layer chromatography. The analyst's choice will depend on factors such as equipment availability, product to be analysed and the required accuracy and precision of analysis.