



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ STEVIOLGLYKOSIDŮ V NÁPOJÍCH

DETERMINATION OF STEVIOL GLYCOSIDES IN BEVERAGES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. VLADIMÍRA PORUBČANOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0909/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Vladimíra Porubčanová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Stanovení steviolglykosidů v nápojích

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Botanická charakteristika stévie (Stevia rebaudiana B.)
- 2) Biologicky účinné látky obsažené ve stévii
- 3) Využití těchto látek v potravinářství
- 4) Přehled HPLC postupů stanovení sladkých látek stévie

Experimentální část:

- 1) Vývoj chromatografického systému pro dělení sladkých látek stévie cukerné
- 2) Ověření vyvinutého separačního systému na reálných vzorcích nápojů obsahujících sladké látky nebo extrakty ze stévie
- 3) Diskuse získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Vladimíra Porubčanová
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá sladkými látkami z rastliny stévie sladkej a ich stanovením v nápojoch. Snahou bolo upraviť metódu separácie majoritných steviol-glykozidov (stéviozidu a rebaudiozidu A) pomocou HPLC tak, aby bola dostatočne rýchla a účinná.

V experimentálnej časti sa podarilo vyvinúť metódu separácie tak, že je možné popri steviol-glykozidoch stanoviť i konzervačné látky, konkrétne kyselinu benzoovú a sorbovú (reps. ich sodné alebo draselné soli). Najskôr bola pre analýzu použitá monolitická kolóna, na ktorej sa však stéviozid a rebaudiozid A nepodarilo rozdeliť. Ďalšie analýzy boli uskutočnené na kolóne Ascentis Express C18 (s rozmermi 150 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 2,7 μm). Najvhodnejšia separácia bola uskutočnená pomocou mobilnej fázy so zložením acetonitril a acetátový pufor (pH 4,2) v pomere 29:71 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola nastavená na 0,28 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a kolóna bola vyhrievaná na teplotu 50 °C. Analýza steviol-glykozidov a konzervačných látok za týchto podmienok bola overená i na vzorkách reálnych nápojov.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with sweet substances from *Stevia rebaudiana* and with their determination in beverages. The ambition was to adjust the separation method for major steviol glycosides (stevioside and rebaudioside A) by HPLC so as to be fast and effective enough, too.

In experimental part was successfully developed the separation method, so it is possible to determine the steviol glycosides and conservation substances, specifically benzoic and sorbic acid (eventually their sodium or potassium salts). At first, for analysis was used monolithic column, on which stevioside and rebaudioside A weren't separated. Other analyses were performed on column Ascentis Express C18 (150 x 4.6 mm; 2.7 μm). The most suitable separation method was performed by mobile phase made up with 29:71 v/v mixture of acetonitrile and acetate buffer (with pH 4.2). The flow rate was 0.28 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and the column temperature was kept constant at 50 °C. The analysis of steviol glycosides and conservation substances with these conditions was verified on the samples of real beverages.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Stévia sladká, stéviozid, rebaudiozid A, HPLC

KEYWORDS

Stevia rebaudiana, stevioside, rebaudioside A, HPLC

PORUBČANOVÁ, V. *Stanovení steviolglykosidů v nápojích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 66 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom iba so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce, pani RNDr. Milene Vespalcovej Ph.D. za umožnenie spracovania témy, ktorá ma zaujíma, ale i za odborné vedenie, konzultácie a čas, ktorý mi venovala počas celej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ	7
2.1	Charakteristika stévie sladkej	7
2.1.1	História a rozšírenie	7
2.1.2	Botanický popis	8
2.1.3	Pestovanie stévie sladkej	9
2.2	Sladké látky stévie	10
2.2.1	Stéviozid	13
2.2.2	Rebaudiozid A	14
2.2.3	Ďalšie steviol-glykozidy	15
2.2.4	Minoritné diterpénové glykozidy	16
2.3	Nesladké látky stévie	16
2.4	Využitie steviol-glykozidov v potravinárstve	18
2.5	Stanovenie steviol-glykozidov metódou HPLC	19
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Použité pomôcky	24
3.1.2	Použité prístroje	24
3.1.3	Použité chemikálie	24
3.1.4	Príprava roztokov a reálnych vzoriek	25
3.1.5	Príprava mobilných fáz	26
3.2	Metóda	27
3.2.1	Monolitická kolóna	27
3.2.2	Kolóna Ascentis Express C18	27
3.2.3	Prídavok konzervačných látok a ich separácia	28
3.2.4	Zmena teploty separácie	28
3.3	Validácia zvolenej metódy	29
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	31
4.1	Separácia stéviozidu a rebaudiozidu A	31
4.1.1	Využitie monolitickej kolóny	31
4.1.2	Využitie kolóny Ascentis Express C18	34
4.1.3	Prídavok konzervačných látok a ich separácia	39
4.1.4	Zmena teploty separácie	43
4.2	Validácia zvolenej metódy	45
4.3	Analýza reálnych vzoriek nápojov	49
5	ZÁVER	51
6	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	52
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	56
8	ZOZNAM PRÍLOH	57
9	PRÍLOHY	58

1 ÚVOD

V súčasnej dobe sa zvyšuje počet obéznych ľudí i ľudí trpiacich cukrovkou (latinsky diabetes mellitus). Tento trend je okrem iného spôsobený aj vysokým príjmom cukru z potravín, či pitím veľkého množstva sladených nápojov. V dôsledku toho sa čoraz viac využívajú nízkoenergetické sladidlá. Pre spotrebiteľov sú však atraktívnejšie než syntetické sladké látky, práve sladidlá, ktoré pochádzajú z prírodných zdrojov. Jedná sa napríklad o rastlinu s názvom Stévia sladká (latinsky *Stevia rebaudiana* Bertoni).

Táto rastlina pochádza z Južnej Ameriky a je možné ju pestovať i u nás. Jednotlivé časti rastliny obsahujú sladké látky, nazývané steviol-glykozidy. Jedná sa o stéviozid, rebaudiozid A až F, dulkozid A a steviolbiozid. Majú podobnú štruktúru, tvorenú steviolovou kostrou, na ktorej sú naviazané glukózové, ramnózové alebo xylózové jednotky. Tieto látky sú niekoľko stonásobne sladšie než sacharóza. Ich najväčší obsah je v listoch, preto sa v potravinárskom priemysle najčastejšie využívajú práve extrakty z listov. Okrem sladkej chuti s takmer žiadnou energetickou hodnotou majú tieto extrakty i ďalšie pozitívne vlastnosti a účinky. Nezvyšujú, dokonca znižujú hladinu glukózy v krvi, znižujú krvný tlak, majú protizápalové, antimikrobiálne aj antioxidačné účinky, neprispievajú k tvorbe zubného kazu a je možné ich využiť i na liečbu hnačky [1].

V Japonsku sa extrakty stévie používajú už veľmi dlho. V Spojených štátoch amerických, Austrálii a na Novom Zélande sú povolené ako doplnok stravy od roku 2008. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) schválil v Európskej únii používanie steviol glykozidov ako sladidla v novembri roku 2011 [2]. Odvtedy sa čoraz častejšie pridávajú hlavne do nápojov, kde čiastočne nahrádzajú iné neenergetické aj energetické sladké látky. Preto sa táto diplomová práca zaoberá vývojom rýchlej a účinnej metódy pre stanovenie steviol-glykozidov, napríklad v nápojoch.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Charakteristika stévie sladkej

2.1.1 História a rozšírenie

Stévia sladká (po latinsky *Stevia rebaudiana*), nazývaná tiež ako stévia cukrová, je ako sladidlo využívaná Indiánmi z kmeňa Guaraní už mnoho storočí. Nazývali ju Azuca-caá (sladká tráva), či Kaá-he-é. V odbornej literatúre ju prvýkrát popísal paraguayský profesor Moise Santiago Bertoni ako *Eupatorium rebaudianum*. Rastlina dostala svoj druhový názov po profesorovi Ovidiovi Rebaudiovi z poľnohospodárskej fakulty v Asuncióne v Paraguaji. Zasláním Bertoniho popisu rastliny a vzoriek listov do britskej botanickej záhrady v Kew bolo rozhodnuté, že stévia patrí viac k rodu *Stevia* než *Eupatorium* a na základe toho bola rastlina v roku 1905 premenovaná na *Stevia rebaudiana* [3].

Táto rastlina pochádza z južnej Brazílie a zo severovýchodu Paraguaya, konkrétne z oblasti Amambay západne od Ánd. Rastie v nadmorskej výške 200-600 m v močaristých pôdach, na brehoch riek alebo na trávnatých pampách [4]. Z pôvodnej oblasti výskytu bola privezená v roku 1971 do Japonska, kde sa začala pokusne pestovať hlavne na ostrovoch Hokkaido a Okinawa. Po šiestich rokoch začala japonská firma Maruzen Kasei Co. obchodovať s extraktom zo stévie. V súčasnosti je najväčším svetovým producentom práve Japonsko. Vypestuje niekoľko desiatok tisíc ton suchých listov ročne a vyrába približne 3 000 ton sladidla. Stévia sladká sa postupne rozšírila aj do ďalších štátov juhovýchodnej a východnej Ázie, ako sú Čína, Kórea, Thajsko a Vietnam. V súčasnosti sa pestuje tiež v USA i v európskych krajinách [5].



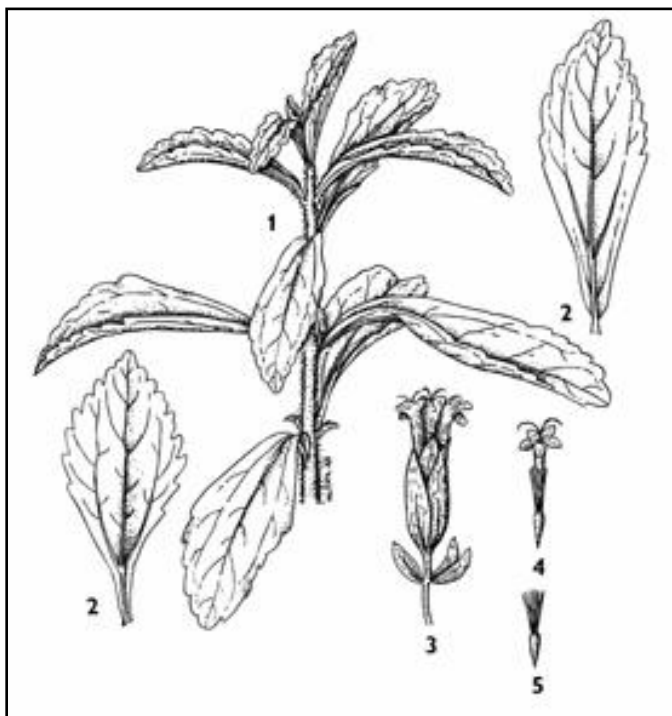
Obrázok 1: Stévia sladká [6]

2.1.2 Botanický popis

Rod stévia zahŕňa približne 230 druhov, avšak len 2 z nich, konkrétne *rebaudiana* a *phlebophylla* produkujú sladké látky steviol-glykozidy [7]. Patria do čeľade astrovité, latinsky *Asteraceae*.

Stévia sladká nemá veľmi vyvinutý koreňový systém, rozprestiera sa len plytko pod povrchom pôdy. Je to zároveň jediná časť rastliny, ktorá nie je sladká. Stonka je bohato vetvená a dorastá do výšky 0,3-1,8 m. Stonky a lístky mladých rastlín sú pokryté chlpkami, starnutím rastliny toto ochlpenie ubúda. Zelené listy, 3-8 cm dlhé a 2-3,5 cm široké sú úzko deltovité až vajcovité (Obrázok 1). V hornej časti majú výrazné vrúbkovanie. Vzhľad listov sa pred začiatkom kvitnutia mení. Listy na výhonkoch s kvetmi sú užšie a celkovo menšie. Stévia kvitne v strapcovitých súkvetiach – úboroch, ktoré sú rozložené vo vrcholovej časti stonky. Sú tvorené drobnými, obojpohlavnými 3-5 trúbkovitými kvetmi bielej, prípadne ružovkastej farby. Kalich je tvorený piatimi zrastenými lístkami. V korune sa nachádza dvojklanná blizna a päť tyčiniek, ktoré majú dlhé nitky [5]. Úzky a trúbkovitý tvar kvetu s hlboko umiestnenou korunkou spôsobujú ťažší prístup opeľovania hmyzom. Plodom rastliny sú úzke tmavohnedé nažky, ktoré sú približne 3 mm dlhé a vďaka približne 20 chlpkom na povrchu sú ľahko prenášané vetrom. Avšak pomerne rýchlo strácajú schopnosť klíčiť, za štyri mesiace klesá až o 40-70 %. Hmotnosť 1 000 semien sa pohybuje medzi 0,3 až 0,4 g [8].

Rozmnožovaním pomocou semien nie je možné dosiahnuť produkciu homogénnej populácie, výsledkom čoho je rozmanitosť dôležitých vlastností, ako napríklad zloženie a stupeň sladkosti. Stévia je práve preto najčastejšie rozmnožovaná odrezkami stoniek, ktoré sa ľahko zakoreňujú. Toto vegetatívne rozmnožovanie je však limitované nízkym počtom jednotlivých rastliniek, ktoré je možné získať súčasne z jednej materskej rastliny [9].



Obrázok 2: Stévia sladká (1 – časť rastliny, 2 – list, 3 – súkvetie, 4 – kvet, 5 – plod) [5]

2.1.3 Pestovanie stévie sladkej

Táto rastlina je nenáročná na pestovanie. Veľmi dobre rastie na hlinitopiesočnatých pôdach sedimentového alebo vulkanického pôvodu s hodnotou pH v rozmedzí 4,4-5,0 (niekedy môže byť pH medzi 6,5-7,5, pretože existuje približne 90 rôznych druhov stévie sladkej v závislosti na odlišných klimatických podmienkach počas pestovania). Stévia potrebuje pre svoj rast dostatočnú vlahu v pôde. Hladina spodnej vody by mala byť v hĺbke 0,3-0,5 m [8]. Nedostatkem vody môžu stonky a listy rýchlo vyschnúť, no po dodaní vlahy sa znovu obnovia.

Najvhodnejšia teplota pre pestovanie stévie je medzi 20 až 24 °C. Nižšia teplota znamená pokles tvorby biomasy dôsledkom čoho je zároveň nižšia produkcia stéviozidu. Znížením okolitej teploty pod 9 °C rastlina zvyčajne vyhynie. Teplotu blízko nuly prežije len výnimočne. Z tohto dôvodu môže byť v tropických oblastiach pestovaná ako trvalka. V miernom pásme a v oblasti Stredozemného mora s horúcimi a daždivými letami je pestovaná len ako jednoročná plodina, ktorá rastie od jari do jesene. Prípadne môže byť pestovaná v skleníkoch [10]. Pri prezimovaní rastliny je vhodné využiť okrem samotnej zeminy ešte ďalší substrát, pretože samotná zemina umožní prežiť menej než 80 % rastlín. Ruskí vedci vypracovali v roku 1991 štúdiu, ktorá sa týkala výberu najvhodnejšieho substrátu pre prezimovanie stévie. Zistili, že prezimovaním v pilinách prežilo 83,3 %, v piesku 90 % a v perlite 100 % rastlín uskladnených v skladových priestoroch. U rastlín prezimujúcich v miestnosti s vyššou vlhkosťou vzduchu, než aká je v skladoch bol najvhodnejším substrátom piesok a piliny [11]. Dni s dlhším slnečným svitom podporujú rast listov a množstvo stéviozidu v nich, zatiaľ čo kratší slnečný svit počas dňa podporuje úrodu kvetov.

Rastliny môžu byť využívané na komerčnú produkciu až 8 rokov, pričom zber vegetatívnych častí býva uskutočňovaný v priebehu roka 6krát. Vďaka tomu, že korene ostávajú pod zemou sa rastlina môže rýchlo regenerovať. Množstvo suchých listov, ktoré je možné získať z jednej rastliny sa pohybuje v rozmedzí od 15 do 35 g. Rastliny vysadené na jednom hektári pôdy môžu vyprodukovať 1 000-1 200 kg suchých listov, z ktorých je možné získať množstvo 60-70 kg stéviozidu. Pre porovnanie, cukrová repa či cukrová trstina vyprodukuje viac cukru, avšak množstvo 70 kg stéviozidu, ktorý je 300krát sladší než sacharóza, je ekvivalentné výťažku 21 000 kg cukru z jedeného hektáru cukrovej repy alebo trstiny [12].

Stévia nemá vysoké nároky na výživu, vyžaduje hlavne časté povrchové zavlažovanie. Zvyčajne sa zavlažovanie aplikuje najmenej raz za týždeň alebo keď vrchol stonky začne upadať.

Pri pestovaní vo veľkom množstve na poli sa jednotlivé rastlinky sadia do riadkov vzdialených od seba 45 cm (Obrázok 3). Vysádzaním v skleníkoch býva vzdialenosť rastliniek menšia, približne 15 až 20 cm. Menšia vzdialenosť sadenia je v dôsledku možnosti častejšej závlahy. Pri sadení na poli by jednotlivé rastliny mohli mať nedostatok vlahy. Voľne v záhradách sa stévia vysádza po 15. máji, aby sa predišlo neskorým mrazom. Sadenice majú výšku 8-14 cm a na stebľách majú 8-14 listov [13].



Obrázok 3: Pestovanie stévie [14]

2.2 Sladké látky stévie

Sladkú chuť častí rastliny spôsobujú diterpénové glykozidy. Sú to sekundárne metabolity rastliny, ktoré obsahujú sacharidovú časť naviazanú na nesacharidovú zložku, nazývanú aglykón. Majú špecifické názvy podľa typu cukru, ktorý obsahujú. Môžu to byť napríklad glukozidy, fruktozidy, pentozidy a ďalšie. [15]. Diterpénové glykozidy, ktoré sa nachádzajú v stévii sladkej sa nazývajú steviol-glykozidy, a to konkrétne: stéviozid, steviolbiozid, rebaudiozid A, B, C, D, E, F a dulkozid A. Tieto zlúčeniny patria medzi neenergetické, ale zároveň intenzívne sladidlá. Množstvo jednotlivých steviol-glykozidov závisí na kultivácii a podmienkach pestovania rastliny [16]. Rozdiely v obsahu týchto látok sa líšia i medzi jednotlivými krajinami, čo je možné vidieť v tabuľke 1.

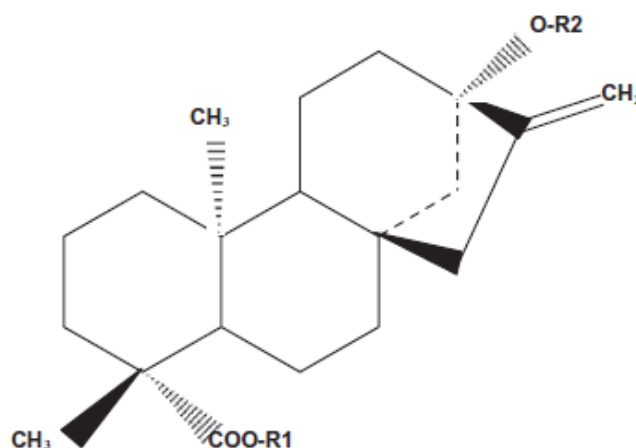
Tabuľka 1: Percentuálny obsah steviol-glykozidov v 100 g suchých listov stévie z viacerých krajín [17]

Krajina	Stéviozid	Rebaudiozid A	Rebaudiozid C
Rusko (mesto Voronež)	5,8	1,2	0,5
Ukrajina (Krym)	4,8	1,3	0,3
Južná Kórea	5,5	2,5	1,4
Čína	6,6	3,7	2,1
Paraguaj	4,6	1,9	0,9
Japonsko	7,7	1,9	0,9
Kanada	2,0	0,3	0,1

Snaha popísať chemickú štruktúru steviol-glykozidov sa začala rozvíjať začiatkom 20. storočia, avšak výskumy napredovali pomaly. V roku 1908 získal Rasenack extrakciou listov horúcim alkoholom kryštalický glykozid, ktorý pomocou kyslej hydrolýzy poskytol druhý kryštalický produkt. O rok neskôr Dieterich extrahoval listy a vetvičky rastliny vodou. Získal 2 frakcie: kryštalickú „eupatorin“, ktorá bola rozpustná v alkohole a amorfnú „rebaudin“, nerozpustnú v alkohole. Obe boli mnohonásobne sladšie než sacharóza, avšak amorfná forma mala ešte vyššiu sladkosť než kryštalická. Ani jedna z týchto zlúčenín nebola bližšie charakterizovaná až do roku 1931, keď Bridel a Lavieille extrahovali listy stévie zriedeným alkoholom, čím získali čistý kryštalický glykozid. Tento produkt bol 300krát sladší než sacharóza. Pôvodný názov glykozidu bol eupatorin, avšak neskôr bol premenovaný na stéviozid, kvôli zmene v nomenklatúre rastliny z *Eupatorium rebaudianum* na *Stevia rebaudiana* [3].

Až v sedemdesiatych rokoch 20. storočia Osamu Tanka s kolegami na hirošimskej univerzite v Japonsku prvý raz izolovali a charakterizovali i ďalšie sladké zlúčeniny v stévii, vrátane rebaudiozidov A až E. Identifikácia steviol-glykozidov bola uskutočnená pomocou ^{13}C -NMR. Neskôr bolo zistené, že rebaudiozid B a steviolbiozid sa nevyskytujú v listoch rastliny, ale vznikajú parciálnou hydrolýzou počas ich extrakcie [16].

Spoločným znakom všetkých diterpénových glykozidov izolovaných z listov stévie je základná kostra tvorená steviolom (Obrázok 4). Steviol je diterpénový aglykón a nemá sladkú chuť. Jeho systematický názov je kyselina *ent*-kaur-16-én-19-ová a bol popísaný v roku 1960. Je možné ho získať alkalicou hydrolýzou sladkých steviol-glykozidov, čím sa odštiepia sacharidové jednotky [16]. Prekurzorom pri jeho biosyntéze je *ent*-kaurenová kyselina [8]. Steviol-glykozidy sa však líšia v type a polohe monosacharidového zvyšku (R1 alebo R2), ktorý môže byť naviazaný v pozícií C13 alebo C19. Štruktúra a sladkosť týchto zlúčenín je uvedená v tabuľke 2. Ich sladkosť sa zvyšuje so zvyšujúcim sa množstvom sacharidových jednotiek naviazaných na steviolovú kostru. So zvyšovaním sladkosti však ich obsah v rastline klesá [18].

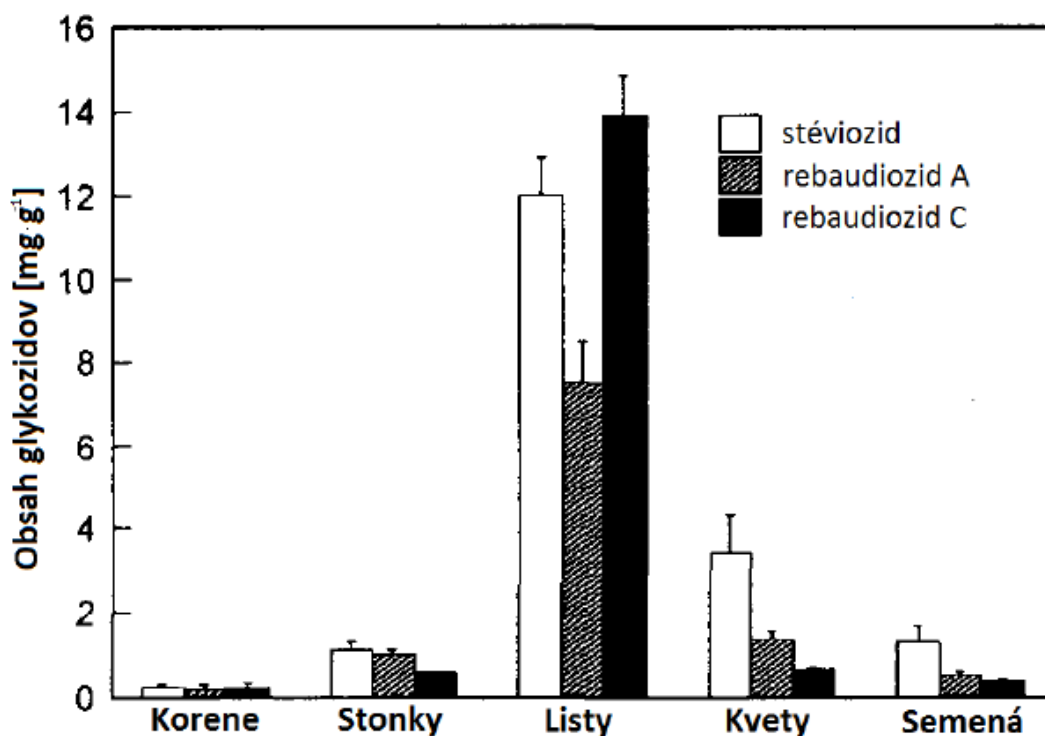


Obrázok 4: Základná steviolová kostra [18]

Tabuľka 2: Štruktúra a sladkosť steviol-glykozidov [18] [19]

Zlúčenina	R1	R2	Sumárny vzorec	Sladkosť
Steviol	H	H	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	–
Steviolbiozid	H	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	100 – 125
Stéviozid	β-Glu	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	250 – 300
Rebaudiozid A	β-Glu	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	350 – 450
Rebaudiozid B	H	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	300 – 350
Rebaudiozid C	β-Glu	β-Glu-α-Ram(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂	50 – 120
Rebaudiozid D	β-Glu-β-Glu(2→1)	β-Glu-β-Glu(2→1) β-Glu(3→1)	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	200 – 300
Rebaudiozid E	β-Glu-β-Glu(2→1)	β-Glu-β-Glu(2→1)	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	250 – 300
Rebaudiozid F	β-Glu	β-Glu-β-Xyl(2→1) β-Glu(3→1)	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	–
Dulkozid A	β-Glu	β-Glu-α-Ram(2→1)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	100 – 125

Obsah steviol-glykozidov je v jednotlivých orgánoch rastliny rôzny. Graf 1 znázorňuje ich rozloženie vo vegetatívnych a generatívnych častiach rastliny. V koreňoch je ich množstvo nepatrné, preto ani nemajú sladkú chuť. Najväčšie množstvo steviol-glykozidov sa nachádza v listoch. Ich obsah značne stúpa v období prechodu z vegetatívnej do generatívnej fázy rastu. Práve suché listy sa využívajú na výrobu extraktov a náhradných sladidiel [20].



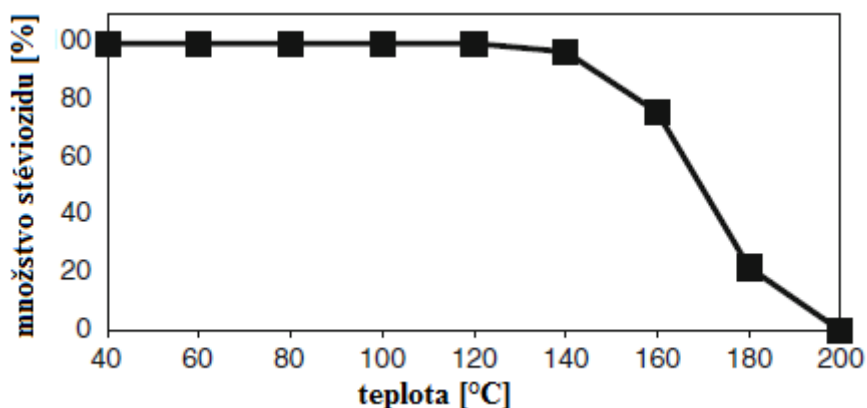
Graf 1: Percentuálny obsah steviol-glykozidov v jednotlivých častiach rastliny [20]

2.2.1 Stéviozid

Stéviozid, zriedka nazývaný ako eupatorin, rebuadin, stevin alebo steviosin, je najpreštudovanejším a podľa viacerých zdrojov i najviac zastúpeným steviol-glykozidom v listoch stévie [16, 17]. Vyskytuje sa v nich v množstve 4-13 %. Závisí to na podmienkach pestovania i na ontogenéze rastliny [20]. Jeho sladkosť je 250-300krát vyššia v porovnaní s 10% roztokom sacharózy, avšak čistý stéviozid zanecháva v ústach horkú pachuť. Systematický názov tejto látky je 13-*O*-(2- β -glukosyl- β -glukosyl)-19-*O*- β -glukosylsteviol alebo 13-*O*- β -soforosyl-19-*O*- β -glukosylsteviol a jeho molárna hmotnosť je 804,87 g·mol⁻¹ [8]. Tento biely kryštalický materiál má teplotu topenia v rozsahu 196-198 °C. Jeho kryštály stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]_D^{24} = -20,8^\circ$. Vo vode je málo rozpustný (0,13 %), lepšie sa rozpúšťa v etanole alebo dioxáne [16].

Jeho hydrolýzou katalyzovanou enzýmom vzniká aglykón steviol. Hydrolýzou katalyzovanou kyselinou vzniká izosteviol a zmydlením stéviozidu pomocou veľmi silnej zásady vzniká steviolbiozid [16].

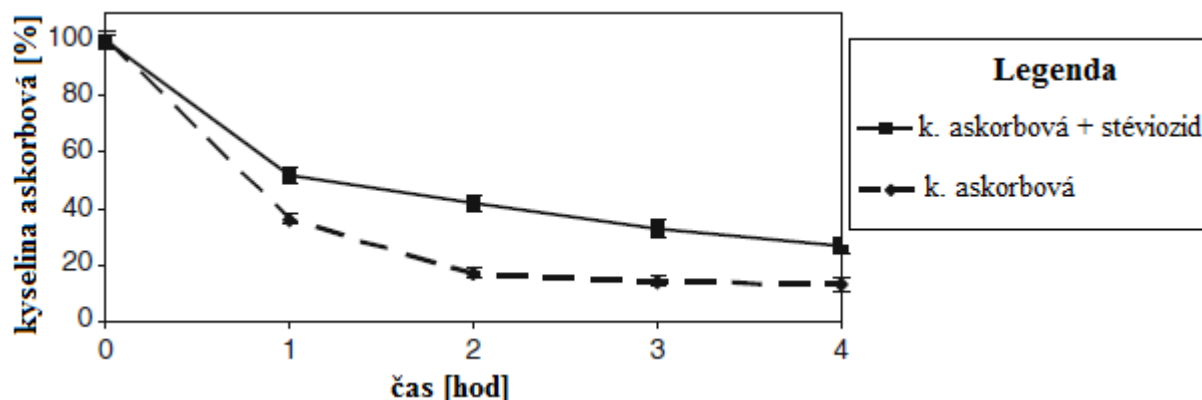
Stéviozid je odolný voči teplotám do 120 °C. Zvýšením teploty dochádza k čiastočnému rozkladu a pri zahriatí nad 200 °C nastáva jeho úplný rozklad. Graf 2 ukazuje závislosť množstva stéviozidu pri zvyšovaní teploty [21].



Graf 2: Teplotná stabilita stéviozidu [21]

Táto zlúčenina je tiež stabilná v širokom rozmedzí pH od 2 do 10 i pri zvýšenej teplote. Pri dvojhodinovom zahrievaní na 60 °C nebol zaznamenaný pokles obsahu stéviozidu. Vyššia teplota o 20 °C spôsobila straty obsahu stéviozidu len 5 %.

Stéviozid bol inkubovaný 4 hodiny pri teplote 80 °C jednotlivo s vitamínmi skupiny B a vitamínom C. Vitamíny skupiny B ani stéviozid nevykazovali žiadne zmeny v koncentráciách. V prípade vitamínu C, ktorý je termolabilný, bola pozorovaná znížená rýchlosť jeho degradácie v dôsledku prítomnosti stéviozidu, čo je možné vidieť z grafu 3 [21].



Graf 3: Graf znázorňuje vyššiu stabilitu kyseliny askorbovej v zmesi so stéviozidom [21]

2.2.2 Rebaudiozid A

Ďalší dôležitý steviol-glykozid v stévií sa nazýva rebaudiozid A. Jeho sladkosť je vyššia v porovnaní so stéviozidom, avšak na rozdiel od neho nezanecháva v ústach horkú pachuť vďaka obsahu ďalšieho glukózového zvyšku. Je tiež rozpustnejší vo vode než stéviozid (rozpustnosť 0,8 %), ale je len málo rozpustný v etanole. Systematický názov tejto zlúčeniny je 2'-O-β-glukosyl-13-O-β--soforosyl-19-O-β-glukosylsteviol [8]. Teplota topenia rebaudiozidu A je 242-244 °C a jeho molekulová hmotnosť je 967,01 g·mol⁻¹ [16]. Kryštalizáciou z metanolu vznikajú bezfarebné ihličkové kryštály, ktoré stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_D = -20,8^\circ$ [8].

Komerčne distribuovaná purifikovaná forma steviol-glykozidov s prevahou rebaudiozidu A je známa ako rebiana. Podľa JECFA musí obsahovať viac ako 97 % rebaudiozidu A [22]. Vo forme bieleho prášku je veľmi stabilná. Skladovaním po dobu 24 mesiacov v polyetylénovom vrecku došlo k stratám len 1-2 % rebaudiozidu A. Primárne boli degradované iné steviol-glykozidy. Rebiana tiež vykazuje i veľmi dobrú tepelnú stabilitu až do 200 °C, čo bolo overené v laboratóriu pri procese pečenia. V kyslom prostredí je stabilnejšia než ostatné často využívané intenzívne sladidlá, čo je dôležité pre komerčnú výrobu nápojov [23].

2.2.3 Ďalšie steviol-glykozidy

Rebaudiozid B sa od rebaudiozidu A líši hydroxylovou skupinou na uhlíku C₁₉, vďaka ktorej má kyslejší charakter rovnako ako steviolbiozid. V listoch rastliny sa nevyskytuje, ale vzniká pri ich extrakcii. Teplotu topenia má v rozmedzí 193-195 °C a jeho molekulová hmotnosť je 804,87 g·mol⁻¹. Jeho rozpustnosť je 0,1 %. Kryštály rebaudiozidu B stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -45,4^{\circ}$ [16].

Rebaudiozid C, tiež nazývaný ako dulkozid B, má v porovnaní s rebaudiozidom A nahradenú glukózu viazanú na vetviacu glukózu do polohy 2 ramnózou viazanou α -uhlíkom. Teplotu topenia má vyššiu, v rozmedzí 215-217 °C. Kryštalizáciou z metanolu vznikajú bezfarebné ihličkovité kryštáliky, ktoré stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -29,9^{\circ}$. Jeho sladkosť je nižšia v porovnaní so stéviozidom a rebaudiozidom A aj B, pretože jednu glukózu má nahradenú ramnózou [16].

Rebaudiozid D obsahuje vo svojej štruktúre na rozdiel od rebaudiozidu A ešte jednu glukózu v polohe 2 glukózy viazanej na uhlíku C₁₉ [8]. Teplotu topenia má v rozmedzí 283-286 °C a jeho kryštály stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -22,7^{\circ}$ [16].

Rebaudiozid E v porovnaní s rebaudiozidom D má o jednu glukózu menej na vetviacej glukóze viazanej na uhlík C₁₃ v polohe 2 [8]. Teplotu topenia má v rozmedzí 205-207 °C. Jeho kryštály stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -34,2^{\circ}$. Tento steviol-glykozid má z nich najvyššiu rozpustnosť vo vode: 1,7 % [16].

Rebaudiozid F je málo preskúmaná látka. Obsahuje okrem glukózovej jednotky aj xylózovú jednotku. Táto látka stáča rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -25,5^{\circ}$ [24].

Dulkozid A je štruktúrou podobný rebaudiozidu C. Avšak, na rozdiel od neho má na vetviacej glukóze v polohe 3 atóm vodíku [8]. Teplotu topenia má v rozmedzí 193-195 °C. Kryštalizáciou z metanolu vznikajú bezfarebné ihličkovité kryštáliky, ktoré stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -50,2^{\circ}$. Jeho sladkosť je nižšia v porovnaní so stéviozidom a rebaudiozidom A aj B, pretože jednu glukózu má nahradenú ramnózou [16].

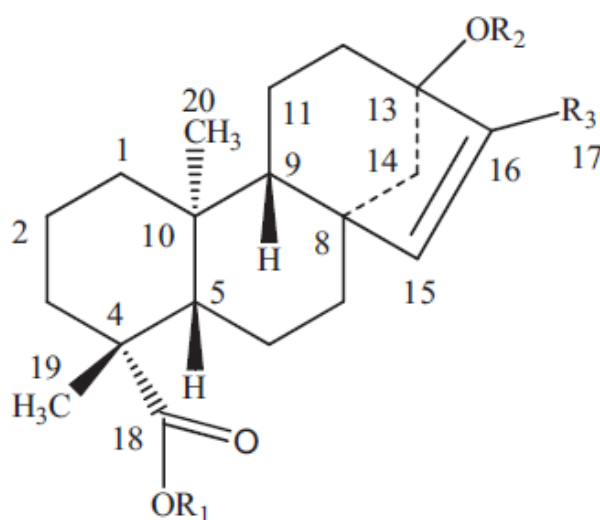
Steviolbiozid sa svojou štruktúrou najviac podobá stéviozidu, líši sa od neho len náhradou glukózy na uhlíku C₁₉ za atóm vodíku [8]. Teplotu topenia má v rozmedzí 188-192 °C. Kryštály stáčajú rovinu polarizovaného svetla $[\alpha]^{24}_{\text{D}} = -34,5^{\circ}$. Vo vode je málo rozpustný (iba 0,03 %) [16]. Ako už bolo spomenuté, steviolbiozid ani rebaudiozid B sa v rastline nevyskytujú, ale vznikajú parciálnou hydrolýzou počas jej extrakcie.

2.2.4 Minoritné diterpénové glykozidy

Z komerčného extraktu boli izolované a detekované ďalšie diterpénové glykozidy, ktoré sú však v rastline zastúpené len vo veľmi malom množstve. Konkrétne sú to:

- (1) 6-*O*-β-D-xylopyranosyl-β-D-glukopyranosyl ester kyseliny 13-[(2-*O*-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl)oxy]-kaur-16-én-18-ovej, ktorý je štruktúrou podobný stéviozidu,
- (2) β-D-glukopyranosyl ester kyseliny 13-[(2-*O*-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl)oxy]-17-hydroxy-kaur-15-én-18-ovej
- (3) β-D-glukopyranosyl ester kyseliny 13-[(2-*O*-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl)oxy]-17-oxo-kaur-15-én-18-ovej
- (4) β-D-glukopyranosyl ester kyseliny 13-[(2-*O*-β-D-glukopyranosyl-β-D-glukopyranosyl)oxy]-kaur-15-én-18-ovej.

Všetky tieto steviol-glykozidy sú bezfarebné látky olejovitej konzistencie. Ich sumárne a štruktúrne vzorce (tabuľka 3) boli stanovené pomocou ESI-MS a NMR spektier [25].



Obrázok 5: Základná kostra minoritných steviol-glykozidov [25]

Tabuľka 3: Štruktúra minoritných steviol-glykozidov [25]

Zlúčenina	R1	R2	R3	Sumárny vzorec
(1)	xyl-glc (6→1)	glc-glc (2→1)	CH ₂	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂
(2)	glc	glc-glc (2→1)	CH ₂ OH	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₉
(3)	glc	glc-glc (2→1)	CHO	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₉
(4)	glc	glc-glc (2→1)	CH ₃	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈

Vysvetlivky: xyl = β-D-xylopyranosyl, glc = β-D-glykopyranosyl

2.3 Nesladké látky stévie

V rastline sa nachádzajú aj mnohé ďalšie chemické látky, ktoré však nemajú sladkú chuť. Pre rastlinu sú potrebné, pretože plnia rôzne funkcie, napríklad: stavebnú, zásobnú, ochrannú, dodávajú jej horkú chuť, majú antioxidačné účinky, atď.

Proteíny

V roku 2010 bolo v listoch stévie identifikovaných 17 aminokyselín, klasifikovaných ako esenciálne i neesenciálne. Tabuľka 4 uvádza, že listy stévie obsahujú takmer všetky aminokyseliny nevyhnutné pre ľudské telo, vrátane cysteínu a tyrozínu. Chýba však aminokyselina tryptofán. Zvyšky listov po extrakcii môžu byť hodnotným zdrojom nevyhnutných aminokyselín pre ľudské telo [26].

Tabuľka 4: Obsah aminokyselín v listoch stévie [26]

Esenciálne aminokyseliny	g na 100 g	Neesenciálne aminokyseliny	g na 100 g
Metionín	1,45	Tyrozín	1,08
Treonín	1,13	Alanín	0,56
Histidín	1,13	Serín	0,46
Leucín	0,98	Kyselina glutámová	0,43
Fenylalanín	0,77	Cysteín	0,40
Lyzín	0,70	Kyselina asparágová	0,37
Valín	0,64	Glycín	0,25
Arginín	0,42	Prolín	0,17
Izoleucín	0,42		

Lipidy

V oleji z listov stévie bolo identifikovaných 6 mastných kyselín. Z nasýtených mastných kyselín to bola palmitová a stearová, Ďalej 2 kyseliny monoénové olejová a palmitolejová, nenасыtené mastné kyseliny s dvomi dvojitými väzbami boli zastúpené kyselinou linolovou a s tromi dvojitými väzbami kyselinou linolénovou. Kyselina palmitová je v tomto oleji obsiahnutá v najväčšom množstve (27,51 g v 100 g oleja z listov), zatiaľ čo množstvo kyseliny stearovej je najmenšie, iba 1,18 g v 100 g oleja z listov [27].

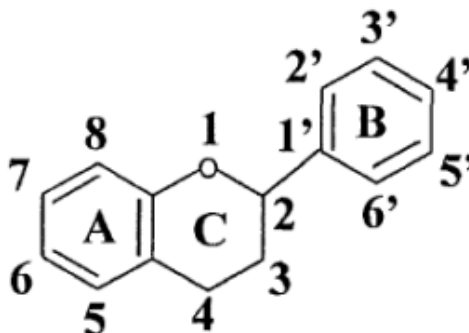
Minerálne látky a vitamíny

V listoch stévie sa v nezanedbateľnom množstve nachádzajú aj minerálne látky, konkrétne draslík, vápnik, horčík a sodík. V menšom množstve i železo, zinok a fosfor [26]. V stévií sa nachádzajú i vo vode rozpustné vitamíny: kyselina listová, vitamín C a vo veľmi malom množstve i vitamín B2 [28]. Obsah týchto minerálnych látok a vitamínov sa v jednotlivých rastlinách líši, pretože závisí na podmienkach pestovania [26, 28].

Polyfenolické látky

Polyfenolické látky sú sekundárne metabolity rastlín, ktoré si ich vytvárajú na obranu proti škodcom a chorobám. Tieto látky predstavujú mnoho typov zlúčenín, napríklad flavonoidy. Najviac zastúpená zlúčenina v listoch je pyrogallol v množstve 951,27 mg na 100 g suchých listov. Ďalej boli v listoch identifikované fenolické látky: kyselina 4-metoxybenzoová, kyselina p-kumarová, 4-metylkatechol, kyselina sinapová a kyselina škoricová. Tie sú však v listoch zastúpené v menšom množstve [28].

Flavonoidy možno rozdeliť do týchto základných skupín: flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, anthokyanidy, izoflavony, dihydroflavonoly a chalkony. Tieto látky sú odvodené od kyslíkatej heterocyklickej zlúčeniny flavanu, ktorého štruktúra je znázornená na obrázku 6 [28]. V listoch rastliny bolo zistených 6 flavonoidných glykozidov: apigenin 4'-*O*-glukozid, kaempferol 3-*O*-ramnozid, luteolin 7-*O*-glukozid, quercetin 3-*O*-arabinozid, quercetin 3-*O*-glukozid a quercetin 3-*O*-ramnozid (kvercetin) [16].



Obrázok 6: Štruktúra flavanu [28]

Diterpény labdanového typu

Medzi tieto látky patria sterebiny. Ich štruktúru a základné fyzikálno-chemické vlastnosti popísal Oshima a kolektív v roku 1986. V stévii sa nachádzajú sterebiny A-H. Z metanolového extraktu listov boli izolované i ďalšie diterpény: jhanol, austroinulin, 6-*O*-acetylaustroinulin a 7-*O*-acetylaustroinulin [16].

Triterpenoidy a steroidy

Z metanolového extraktu listov stévie bol izolovaný triterpenoid β -amyryl acetát a lupeol 3-palmitát. Z tohto extraktu boli izolované i steroidy: β -sitosterol, stigmasterol a campesterol [16].

2.4 Využitie steviol-glykozidov v potravinárstve

Vďaka nízkej energetickej hodnote a zdraviu prospešným účinkom je stévia využívaná v potravinárstve ako náhradné sladidlo. Pridávaná je hlavne do nealkoholických nápojov, kde čiastočne nahrádza repný cukor, či glukózo-fruktózové sirupy. Keďže stévia neprispieva k tvorbe zubného kazu, je často pridávaná do nápojov, ktoré majú v obľube najmä deti. Sladké látky zo stévie sa do potravín najčastejšie pridávajú vo forme extraktov z listov a na etikete sú uvedené ako steviol-glykozidy (aditívum E960). Povolené množstvo steviol-glykozidov pridávaných do jednotlivých druhov nápojov i potravín je limitované nariadením komisie EÚ č. 1131/2011 z 11. novembra 2011. Keďže vďaka relatívne nízkemu povolenému dennému príjmu, len $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ telesnej hmotnosti na deň, sa steviol-glykozidy na sladenie potravín používajú v kombinácii s inými sladiacimi látkami (repný cukor, glukózo-fruktózový sirup alebo syntetické neenergetické sladidlá). Zoznam nápojov a potravín od českých a slovenských výrobcov, v ktorých je použité sladidlo zo stévie je uvedený nižšie.

Nápoje:

Birell Limetka & Malina (Plzeňský Prazdroj, a.s.)
Birell Zázvor (Plzeňský Prazdroj, a.s.)
Frisco Bílé hrozny & Lotos (Plzeňský Prazdroj, a.s.)
Green tea peach (Coca – Cola HBC ČR s.r.o.)
Grena grep & citron (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Jupík so stéviou (Kofola ČeskoSlovensko a.s.)
Koala (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Kofola bez cukru se stévií (Kofola a.s.)
Kombajnéřka (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Malina malinová limča s chmelem (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Nativa ginkgo green tea (Rauch Praha spol. s.r.o.)
Nativa green tea lemon (Rauch Praha spol. s.r.o.)
Nestea Marhule se stévií (Coca-Cola HBC Česká republika, s.r.o.)
Nestea Tropické ovoce se stévií (Coca-Cola HBC Česká republika, s.r.o.)
Rio H₂O s pomarančovou dužinou (McCarter a.s.)
Staropramen Cool Hořký pomeranč (Pivovar Staropramen a.s.)
Staropramen Cool Grep (Pivovar Staropramen a.s.)
Sylvána hroznové víno (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Sylvána hroznové víno s chmelem (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Tonik lahodně hořký (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Vita pomeranč & broskev (Pivovar Černá Hora, a.s.)
Zázvorka (Pivovar Černá Hora, a.s.)

Potraviny

Džem jahoda, malina, borůvka, višně, meruňka (JSG med a.s.)
Ovsený dezert – čoko, s příchuťou vanilky (KALMA K.S.)
Ketchup Stevia (SPAK foods, s.r.o.)
Kečup jemný se sladidly z rostliny stévie (Hellmann's, Unilever ČR, spol. s.r.o.)
Naturesweet Stevia Lízatko s Rakytníkem (BIOFERM SK, s.r.o.)
Selský jogurt: Mango (Hollandia Karlovy Vary, s.r.o.)
Selský jogurt: Třešeň (Hollandia Karlovy Vary, s.r.o.)
Žuvačky Naturesweet® (BIOFERM SK, s.r.o.)

2.5 Stanovenie steviol-glykozidov metódou HPLC

T. Vaněk s kolektívom analyzovali v roku 2001 steviol-glykozidy v listoch stévie, ale i v ovocnom čaji osladenom listami stévie. Sušené a podrvené listy s hmotnosťou 2 g boli extrahované 2 x 50 ml horúcej vody počas 30 sekúnd. 2 gramy ovocného čaju boli extrahované 100 ml horúcou vodou, avšak doba bola predĺžená na 5 minút. Extrakty po filtrácii cez 5 µm filter boli prečistené extrakciou na pevnej fáze (SPE). Po odparení extraktu vo vákuu a rozpustení v 1 ml metanolu prebehla analýza kvapalinovou chromatografiou.

HPLC prístroj od firmy Labio (Česká republika), ktorý bol použitý na analýzu obsahoval kolónu SiC18 s rozmermi 250 x 4 mm a veľkosťou častíc 7 µm. Teplota kolóny bola

udržiavaná na 25 °C. Nástrek vzorku bol 20 µl. Elúcia prebehla pomocou lineárneho gradientu, ktorý bol na začiatku tvorený zmesou vody a acetonitrilu v pomere 75:15 v/v. Po 30 minútach bola separácia ukončená, pričom mobilná fáza obsahovala vodu a acetonitril v pomere 50:50 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola 1 ml·min⁻¹. Na detekciu bol použitý detektor s diódovým poľom od firmy Waters z USA, nastavený na vlnovú dĺžku 205 nm.

Pri týchto podmienkach analýzy bol retenčný čas stéviozidu približne 15 minút. Detekčný limit pre stéviozid bol 1 µg v nástreku. Vďaka využitiu SPE bol šum základnej línie značne znížený [29].

Z roku 2010 pochádza štúdia Ursuly Wölwer-Rieck s kolektívom, ktorej predmetom bola stabilita stéviozidu a rebaudiozidu A v nápojoch pri skladovaní počas 24, 48 a 72 hodín pri teplote 80 °C. Vzorky pochádzali z 3 komerčných nápojov: kofeínový nápoj, nápoj s citrónovo-limetkovou príchuťou a energetický drink. Po odplynení boli tieto vzorky pridané k roztoku stéviozidu alebo rebaudiozidu A so známou koncentráciou. Po inkubácii boli prečistené SPE. Následne boli vzorky podrobené analýze metódou HPLC na prístroji Varian (Varian Dutschland GmbH, Darmstadt, Nemecko), ktorý obsahoval čerpadlo ProStar 230, automatický dávkovač vzoriek ProStar 410, DAD detektor 335 s nastavenou vlnovou dĺžkou na 210 nm, odplyňovač mobilnej fázy a termostat kolóny Metatherm nastavený na 36 °C.

Stéviozid, rebaudiozid A a ich degradačné produkty boli analyzované s využitím Luna HILIC kolóny s rozmermi 250 x 4,6 mm a predkolóny s rozmermi 4 x 3,0 mm od firmy Phenomenex, USA. Elúcia prebehla v izokratickom móde, pričom mobilná fáza bola tvorená zmesou acetonitrilu a vody v pomere 80:20 v/v, jej rýchlosť toku bola 1 ml·min⁻¹. Objem dávkovaného množstva vzorku bol 20 µl.

Výsledný chromatogram ukazuje rozdelenie jednotlivých steviol-glykozidov, pričom retenčný čas stéviozidu je medzi 7. a 8. minútou a retenčný čas rebaudiozidu A je medzi 10. a 11. minútou [30].

Tím vedcov Jie Liu, Jin-wei Li a Jian Tang vypracovali v roku 2010 štúdiu, ktorá sa zaoberá špecifikáciou extrakčných podmienok s využitím ultrazvuku pre maximálny zisk všetkých sacharidov z listov stévie. 5 gramov čerstvých listov bolo vysušených pri 102 °C. Listy boli suspendované a extrahované 1 000 ml vody pri rôznych teplotách a sile ultrazvuku.

Analýza prebiehala na HPLC prístroji Agilent 1100 od firmy Agilent Ltd., USA so Zorbax Eclipse XDB-C18 kolónou. Ako mobilná fáza bola využitá zmes acetonitrilu a vody v pomere 70:30 v/v, s rýchlosťou toku 1 ml·min⁻¹. Teplota vyhrievania kolóny bola nastavená na 25 °C. Detekcia steviol-glykozidov bola zabezpečená nastavením vlnovej dĺžky 210 nm na detektore Intelligent UV/VIS od firmy Jasco, Japonsko. Všetky vzorky boli filtrované cez 0,45 µm filter a následne boli dávkované na kolónu v objeme 10 µl.

V tabuľke s výsledkami je uvedený retenčný čas pre stéviozid 5,2 min. a pre rebaudiozid A 6,97 min. V listoch rastliny bol stanovený obsah stéviozidu na 16,4 ± 1,32 % a obsah rebaudiozidu A na 12,1 ± 1,12 % hmotnosti suchých listov [31].

Congmin Yu a kolektív vo svojom článku z roku 2011 popisujú zavedenie rýchlej metódy pre stanovenie obsahu stéviozidu a rebaudiozidu A v listoch stévie analýzou HPLC a NIR. Listy viacerých rastlín stévie sladkej z čínskych provincií boli vysušené pri 105 °C. Po ich rozomletí na prášok boli trikrát extrahované v deionizovanej vode 100, 50 a 50 ml počas 2 až 4 hodín. Extrakty po filtrácii cez 0,45 µm filter boli dávkované do prístroja HPLC.

Pre analýzu kvapalinovou chromatografiou bol využitý prístroj Agilent 1100 s kolónou Luna NH₂ 100 Å, ktorej rozmery boli 250 x 4,6 mm a veľkosť častíc bola 5 µm. Mobilná fáza obsahovala acetonitril a vodu v pomere 78:22 v/v a rýchlosť jej toku bola 1 ml·min⁻¹. DAD detektor bol nastavený na vlnovú dĺžku 210 nm. Dávkovaný objem vzorku na kolónu ani teplota analýzy nie sú v článku uvedené.

Z výsledkov analýzy vyplynulo, že retenčný čas stéviozidu bol 7,887 minút a retenčný čas rebaudiozidu A bol 11,250 minút [32].

D. Bergs s tímom nemeckých vedcov v článku z roku 2012 popisujú analýzu steviol-glykozidov z listov stévie rýchlou metódou HPLC. Vzorky sušených a na prášok podrvených listov rastliny s hmotnosťou 3 g boli suspendované v 30 g vody pri teplote 30 °C na trepačke PTR30 od firmy Grand Bio, UK. Extrakcia bola uskutočnená v 5 krokoch prietokového extrakčného módu, pričom každý krok trval 3 hodiny na trepačke. Extrakty boli prefiltrované cez 0,2 µm filter a prečistené na SPE kolónke.

Analýza vzoriek bola uskutočnená kvapalinovou chromatografiou na prístroji obsahujúcom 2 čerpadlá Smatline P1050, odplyňovač mobilnej fázy Smartline Manager 5000, spektrofotometrický detektor Smartline PDA 2800 UV/VIS/NIR nastavený na vlnovú dĺžku 210 nm, kolónový termostát Smartline od firmy Knauer, Nemecko, nastavený na 50 °C a automatický dávkovač Triathlon od firmy Spark Holland, Holandsko. Separácia prebehla v kolóne Purospher® STAR RP-18 s rozmermi 250 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 3 µm od firmy Merck, Nemecko. Mobilná fáza bola tvorená zmesou vody MilliQ okyslenej s HCl na pH 2,75 a acetonitrilu v pomere 65:35 v/v. Jej rýchlosť toku bola 1 ml·min⁻¹. Dávkované množstvo prečisteného vzorku bolo 10 µl.

Retenčný čas stéviozidu bol stanovený na 6,05 min. a rebaudiozidu A na 5,72 min. V článku sú uvedené i retenčné časy ďalších steviol-glykozidov a validácia použitej metódy [33].

Japonskí vedci vydali v roku 2013 článok, ktorý sa zaoberá vylepšením analytickej metódy pre stanovenie steviol-glykozidov v norme Spoločného výboru expertov pre potravinové aditíva (JECFA). Zmenou amino kolóny za ODS kolónu docielili zrýchlenie separácie a možnosť stanovenia všetkých 9 steviol-glykozidov. Pôvodná metóda umožnila stanoviť len 7 steviol-glykozidov. Vylepšenie metódy bolo uskutočňované pomocou štandardov látok, ale aj 2 komerčných extraktov stévie.

Analýza látok prebiehala na prístroji Alliance 2695 HPLC systém od firmy Waters, USA s UV-VIS detektorom SPD-10AV od firmy Shimadzu Corporation, Japonsko. Pôvodná metóda JECFA z roku 2008 bola navrhnutá na kolóne Supelcosil LC-NH₂ s rozmermi

250 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 5 μm od firmy Sigma-Aldrich, USA vyhrievanej na teplotu 40 °C. Pre elúciu bola zvolená mobilná fáza obsahujúca zmes acetonitrilu a vody s pH upraveným pomocou kyseliny fosforečnej na hodnotu 3, v pomere 80:20 v/v s rýchlosťou toku 1 ml·min⁻¹. Vlnová dĺžka bola na detektore nastavená na 210 nm.

Upravená metóda bola testovaná na viacerých ODS kolónach s rovnakými rozmermi 250 x 4,6 mm aj veľkosťou častíc 5 μm : Capcell Pak C18 MGII od firmy Shiseido Co., Ltd., Japonsko, Shim-pack CLC-ODS od firmy Shimadzu Corporation, Japonsko a Luna C18 od firmy Phenomenex Co., Ltd., USA. Teplota a vlnová dĺžka boli rovnaké ako v pôvodnej metóde, teda 40 °C a vlnová dĺžka 210 nm. Mobilná fáza obsahovala zmes acetonitrilu a pufrového roztoku, tvoreného 10 mmol·l⁻¹ fosforečnanom sodným s pH 2,6 v pomere 32:68 v/v. Rýchlosť jej toku bola 1 ml·min⁻¹. Testované boli tiež iné pufry, konkrétne: 1,4 mmol·l⁻¹ roztok kyseliny fosforečnej s pH 3,0; 5 mmol·l⁻¹ roztok kyseliny mravčej s pH 3,0; 5 mmol·l⁻¹ roztok mravčanu amónneho s pH 6,1 a 5 mmol·l⁻¹ roztok octanu amónneho s pH 6,6. Najvhodnejší však bol zvolený pufor: 10 mmol·l⁻¹ roztok fosforečnanu sodného s pH 2,6. Mobilná fáza s acetonitrilom a zvoleným pufrom bola testovaná s rôznym pomerom jej zložiek. Tieto pomery boli 35:65, 32:68 a 30:70 objemových jednotiek acetonitrilu a pufru. V prvom prípade boli jednotlivé píky slabo rozlíšené a separácia bola až priveľmi rýchla, v treťom prípade bol šum základnej línie veľmi výrazný a základná línia nebola dostatočne ustálená. Najvhodnejší pomer mobilnej fázy bol stanovený na 32:68 objemových jednotiek acetonitrilu a pufru, a preto bol i využitý vo vylepšenej metóde.

Analýzou podľa pôvodnej metódy z roku 2008 bol získaný chromatogram, z ktorého vyplýva, že retenčný čas stéviozidu je približne 12 minút a pre rebaudiozid A je to 18 minút. Tieto dva steviol-glykozidy sú síce dostatočne oddelené od seba, avšak rebaudiozid E spolu so steviolbiozidom majú spoločný pík a rebaudiozid D sa eluuje z kolóny až 20 minút neskôr než ostatné steviol-glykozidy. Novou metódou s využitím troch ODS kolón boli získané chromatogramy, ktoré sa od seba líšili len málo. Všetky steviol-glykozidy boli od seba dostatočne oddelené a v jednotlivých chromatogramoch mali podobné retenčné časy. Retenčný čas stéviozidu bol medzi 7-8. minútou a rebaudiozidu A medzi 6-7. minútou. V článku je tiež uvedený i limit kvantifikácie, pre stéviozid a rebaudiozid A je to množstvo 3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [34].

Tím španielskych vedcov sa tiež zaoberal vývojom metódy pre rýchlo analýzu majoritných steviol-glykozidov. Vo svojom článku z roku 2014 popísali i optimálnu extrakciu a validáciu vyvinutej metódy. Vzorky pre analýzu tvorili komerčné sladidlá s rôznym obsahom steviol-glykozidov a sušené listy stévie.

Pri analýzach bol využívaný prístroj Agilent 1200 od firmy Palo Alto, USA. Testované boli dve kolóny, Develosil ODS-HG s rozmermi 250 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 5 μm a Luna HILIC s rozmermi 150 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 5 μm od firmy Phenomenex, Francúzsko. Odkúšané boli tiež oba typy elúcie, izokratická i gradientová. Mobilná fáza bola tvorená acetonitrilom a vodou, pri izokratickej elúcií bol pomer zložiek 80:20 v/v. Použitý gradient mobilnej fázy bol nasledovný: 80 % acetonitrilu v čase 0-10 min, pokles obsahu acetonitrilu z 80 na 50 % v čase 10-12 min, ďalší pokles acetonitrilu z 50 na 0 % v čase 12-

14 min, zvýšenie obsahu acetonitrilu na pôvodných 80 % v čase 14-16 min a 80 % acetonitrilu v čase 16-18 min. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Termostat kolóny bol nastavený na 30°C a nástrekový objem bol pri každom vzorku $20 \mu\text{l}$. Chemická štruktúra látok bola zistená na hmotnostnom spektrometri.

Autori vo svojom článku uvádzajú, že z použitých kolón je vhodnejšia Luna HILIC. Z chromatogramov je vidieť, že obe kolóny pri zvolených podmienkach separácie poskytujú rýchlu analýzu, avšak stéviozid a rebaudiozid A nie sú úplne oddelené. Z testovaných typov elúcií je vhodnejšia gradientová. Retenčný čas stéviozidu je 5,15 minút a rebaudiozidu A je 6,15 minút. Detekčný limit stéviozidu i rebaudiozidu A bol stanovený na $1,07 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [35].

T. Bililign s kolektívom sa zaoberali v roku 2014 vývojom a validáciou novej metódy separácie schopnej separovať a kvantifikovať 9 steviol-glykozidov prítomných v extraktoch stévie s vysokou čistotou. Analýzy boli uskutočňované na prístrojoch Agilent 1200 od firmy Wilmington, Nemecko a Waters Alliance 2965 od firmy Milford, USA, pričom použité boli kolóny: YMC ODS-AQ s rozmermi $250 \times 4,6 \text{ mm}$ a veľkosťou častíc $5 \mu\text{m}$ od firmy YMC America, USA, Shiseido Capcell Pak C18 MGII s rozmermi $250 \times 4,6 \text{ mm}$ a veľkosťou častíc $5 \mu\text{m}$ od firmy Shiseido, Japonsko a Scherzo SM-C18 s rozmermi $250 \times 4,6 \text{ mm}$ a veľkosťou častíc $3 \mu\text{m}$ od firmy Imtakt, USA. Mobilná fáza obsahovala acetonitril a pufrový roztok 5 mM dihydrogenfosforečnanu draselného s pH 3. Elúcia prebiehala pomocou gradientu: zvýšenie obsahu acetonitrilu z 10 na 35 % počas 10 minút, 35 % acetonitrilu počas 15 minút, zvýšenie obsahu acetonitrilu z 35 na 75 % počas 10 minút a 75 % acetonitrilu počas 15 minút. Kolóna bola znovu ekvilibrovaná počiatočným zložením mobilnej fázy (10 % acetonitrilu a 90 % pufru). Rýchlosť toku mobilnej fázy bola $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a teplota na termostate kolóny bola nastavená na 32°C . Dávkovaný objem na kolónu bol pri každej vzorke i štandardnom roztoku $15 \mu\text{l}$. Detektor bol nastavený na snímanie vlnovej dĺžky 210 nm .

Výsledný chromatogram obsahuje okrem 9 steviol-glykozidov aj steviol, izosteviol a izosteviolmonoizid. Retenčný čas stéviozidu je 22,4 minút a rebaudiozidu A 21,9 minút. Doba analýzy bola veľmi dlhá, čo nie je praktické [36].

Prehľadná tabuľka podmienok HPLC analýz z literárnej rešerše je uvedená v prílohe č. 1.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Použité pomôcky

- Laboratórne sklo
- mikrofiter (MS CA Syringe, 0,45 µm)
- filtračný papier
- injekčná striekačka
- miešadielko valcové s prsteňom
- mikropipety
- váženka
- vialky

3.1.2 Použité prístroje

- Analytické váhy (HA 202 M, Japonsko)
- HPLC systém
 - 2x čerpadlo (Waters 515, USA)
 - zmiešavač mobilných fáz (Waters Pump Control Module II, USA)
 - automatický dávkovač vzoriek (Waters 717 plus, USA)
 - detektor (Waters 2487 Dual λ , USA)
 - termostat na kolónu (DeltaChromTM, USA)
 - monolitická kolóna Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm, Phenomenex)
 - kolóna Ascentis® Express C18 (150 x 4,6 mm; 2,7 µm, Sigma-Aldrich)
 - predkolóna MetaGuard 4,6 mm Polaris 5 u C18-A (Agilent)
- chladnička Amica AD 250
- magnetická miešačka bez ohrevu
- pH meter (ProfiLine 3210 WTW, Nemecko)
- ultrazvukový kúpeľ (PS 03000A 2,5 l, Notus-powersonic, Slovensko)

3.1.3 Použité chemikálie

- acetonitril (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- demineralizovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- kyselina chlorovodíková (Analytika spol. s.r.o., ČR)
- kyselina benzoová (Lach-Ner, ČR)
- kyselina sorbová (Lach-Ner, ČR)
- ľadová kyselina octová (Scharlan Chemie S.A, EU)
- octan amónny (Lachema, ČR)
- rebaudiozid A (Sigma aldrich, Nemecko)
- zmes stéviozidu a rebaudiozidu A (Stevia SILVER 250, stevioside.cz)

3.1.4 Príprava roztokov a reálnych vzoriek

Zásobný roztok štandardu rebaudiozidu A (čistota > 96 %) s koncentráciou $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických váhach bolo navážené množstvo 0,1000 g rebaudiozidu A, ktoré bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Po vyvinutí vhodnej separačnej metódy bol tento roztok pripravený znovu, ale s použitím mobilnej fázy (29:71, acetonitril a acetátový pufor) namiesto destilovanej vody.

Zásobný roztok zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A (Stevia SILVER 250)

Na analytických váhach bolo navážené množstvo 0,1000 g látky Stevia SILVER 250, ktoré bolo následne kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Zo zásobného roztoku bolo mikropipetou odpipetované množstvo 5 ml do odmernej banky s objemom 50 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou. Tento roztok bol používaný pri vývoji metódy separácie stéviozidu a rebaudiozidu A.

Po vyvinutí vhodnej separačnej metódy bol tento roztok pripravený znovu, ale s použitím mobilnej fázy (29:71, acetonitril a acetátový pufor) namiesto destilovanej vody.

Kalibračné roztoky rebaudiozidu A

Zo zásobného roztoku rebaudiozidu A v mobilnej fáze (29:71, acetonitril a acetátový pufor) s koncentráciou $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo do odmernej banky s objemom 25 ml odpipetované množstvo 2,5 ml. Odmerná banka bola doplnená mobilnou fázou po rysku.

Z tohto roztoku s koncentráciou $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo následne odpipetované množstvo 0,5; 1; 2,5; 5 a 7,5 ml do odmerných baniek s objemom 10 ml. Jednotlivé odmerné banky boli doplnené mobilnou fázou po rysku. Takto boli pripravené kalibračné roztoky s koncentraciami 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075 a $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Zásobný roztok kyseliny benzoovej s koncentráciou $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických váhach bolo navážené množstvo 0,0500 g kyseliny benzoovej, ktoré bolo kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Pre vývoj separačnej metódy bol do prístroja dávkovaný roztok kyseliny benzoovej s koncentráciou $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pripravený bol odpipetovaním 5 ml zásobného roztoku do odmernej banky s objemom 10 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Po vyvinutí vhodnej separačnej metódy boli tieto roztoky pripravené znovu, ale s použitím mobilnej fázy (29:71, acetonitril a acetátový pufor) namiesto destilovanej vody.

Zásobný roztok kyseliny sorbovej s koncentráciou $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Na analytických váhach bolo navážené množstvo 0,0500 g kyseliny sorbovej, ktoré bolo následne kvantitatívne prevedené do odmernej banky s objemom 100 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Pre vývoj separačnej metódy bol do prístroja dávkovaný roztok kyseliny sorbovej s koncentráciou $0,01 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pripravený bol odpipetovaním 2 ml zásobného roztoku do odmernej banky s objemom 10 ml. Odmerná banka bola doplnená po rysku destilovanou vodou.

Po vyvinutí vhodnej separačnej metódy boli tieto roztoky pripravené znovu, ale s použitím mobilnej fázy (29:71, acetonitril a acetátový pufor) namiesto destilovanej vody.

Kalibračné roztoky kyseliny benzoovej

Zo zásobného roztoku kyseliny benzoovej v mobilnej fáze (29:71, acetonitril a acetátový pufor) s koncentráciou $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo odpipetované množstvo 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 a 1 ml do odmerných baniek s objemom 10 ml. Jednotlivé odmerné banky boli doplnené mobilnou fázou po rysku. Takto boli pripravené kalibračné roztoky kyseliny benzoovej s koncentraciami 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,04 a $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kalibračné roztoky kyseliny sorbovej

Zo zásobného roztoku kyseliny sorbovej v mobilnej fáze (29:71, acetonitril a acetátový pufor) s koncentráciou $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ bolo odpipetované množstvo 0,02; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 a 1 ml do odmerných baniek s objemom 10 ml. Jednotlivé odmerné banky boli doplnené mobilnou fázou po rysku. Takto boli pripravené kalibračné roztoky kyseliny sorbovej s koncentraciami 0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,04 a $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Príprava reálnych vzoriek nealkoholických nápojov Grena, Kombajnérka, Zázvorka, Malina, Jupík Multivitamín

Nápoje boli odplynené po dobu 15 minút v ultrazvukovom kúpeli. Následne boli prefiltrované cez mikrofiltre s pórovitosťou $0,45 \mu\text{m}$ nasadený na injekčnú striekačku. Každý nápoj bol zriedený 1:1 destilovanou vodou.

3.1.5 Príprava mobilných fáz

V experimentálnej časti tejto diplomovej práce boli použité viaceré mobilné fázy.

V separáciách č. 1 až 9 (pre oddelenie stéviozidu od rebaudiozidu A) boli zložkami mobilnej fázy acetonitril a demineralizovaná voda, ktorá bola okyslená pomocou koncentrovanej HCl na pH 2,75. Po ich zmiešaní v pomere, ktorý je uvedený pri každej separácii (35:65, 30:70, 25:75, 27:73, 31:69 a 29:71 v/v) bola takto pripravená mobilná fáza odplynená po dobu 15 minút ultrazvukom.

V ďalších separáciách bola pre oddelenie kyseliny benzoovej a sorbovej demineralizovaná okyslená voda nahradená acetátovým pufrom. Ten bol pripravený rozpustením množstva 0,30 g octanu amónneho v 900 ml demineralizovanej vody. Ľadovou kyselinou octovou bolo pH pufru upravené na 4,2 [37]. Takto pripravený pufor bol zmiešaný s acetonitrilom v pomere 71:29 v/v a pripravená mobilná fáza bola ultrazvukom odplynená po dobu 15 minút.

3.2 Metóda

Pri vývoji metódy pre separáciu stéviozidu a rebaudiozidu A boli využité viaceré postupy, ktoré sa líšili v použitej kolóne, predkolóne, v pomere zloženia mobilných fáz, v rýchlosti prietoku mobilnej fázy a teplote separácie. Počas všetkých analýz však ostávalo rovnaké nastavenie detektoru a to na vlnovú dĺžku 210 nm. Objem nástreku vzoriek bol 10 μ l počas všetkých analýz.

3.2.1 Monolitická kolóna

Kolóna Chromolith Performance RP-18e je dlhá 100 mm. Jej vnútorný priemer je 3 mm. Od klasických náplňových sa líši tým, že je tvorená jedným kusom pórovitého materiálu, vďaka čomu má vysokú účinnosť i pri nižšom tlaku. Jedným zo zámerov práce bolo vyskúšať separáciu steviol-glykozidov na tejto kolóne, pretože doteraz nebol uverejnený článok, v ktorom by bola popísaná separácia spomínaných látok na monolitickej kolóne.

Separácia č. 1

Počiatočným bodom vývoja metódy bola literatúra [33]. Použitá bola mobilná fáza, zložená z acetonitrilu a okyslenej demineralizovanej vody v pomere 35:65 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola nastavená na 0,3 ml·min⁻¹. Teplota na termostate kolóny bola nastavená na 30 °C.

Separácia č. 2

Pomer zložiek mobilnej fázy bol upravený na 30:70 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Rýchlosť toku mobilnej fázy i teplota separácie zostali rovnaké ako v separácii č. 1.

Separácia č. 3

Pomer zložiek mobilnej fázy bol upravený na 25:75 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Rýchlosť toku mobilnej fázy bola zmenená na 0,6 ml·min⁻¹. Teplota vyhrievania kolóny zostala rovnaká (30 °C).

3.2.2 Kolóna Ascentis Express C18

Monolitická kolóna bola nahradená kolónou Ascentis Express C-18. Táto kolóna je dlhá 150 mm. Jej vnútorný priemer je 4,6 mm a častice majú priemer 2,7 μ m. Teplotné optimum má od 40 do 60 °C. Je to kolóna s pevným jadrom, ktorá sa vyznačuje vysokou rýchlosťou analýz aj vysokou účinnosťou.

Separácia č. 4

Pomer zložiek mobilnej fázy bol upravený na 30:70 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Rýchlosť toku mobilnej fázy bola zmenená na 0,3 ml·min⁻¹. Teplota vyhrievania kolóny bola nastavená na 40 °C.

Separácia č. 5

Mobilná fáza obsahovala acetonitril a okyslenú demineralizovanú vodu v pomere 27:73 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy zostala $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola nastavená na 40°C .

Separácia č. 6

Pomer zloženia mobilnej fázy bol upravený na 31:69 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Rýchlosť toku mobilnej fázy bola $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola stále nastavená na 40°C .

Separácia č. 7

Pred kolónu bola zaradená predkolóna MetaGuard C18-A. Pomer zložiek mobilnej fázy ostal rovnaký, teda 31:69 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Rýchlosť toku mobilnej fázy ostala $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ i teplota vyhrievania kolóny zostala rovnaká (40°C).

Separácia č. 8

Mobilná fáza obsahovala acetonitril a okyslenú demineralizovanú vodu v pomere 29:71 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy zostala $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola stále nastavená na 40°C .

3.2.3 Prídavok konzervačných látok a ich separácia

Spolu so steviol-glykozidmi je možné stanoviť v nápojoch i niektoré konzervačné látky, ktoré sa do nich pridávajú pre zvýšenie trvanlivosti a zabránenie znehodnotenia mikroorganizmami. Jedná sa hlavne o kyselinu benzoovú (resp. benzoan sodný) a sorbovú (resp. sorban draselný).

Separácia č. 9

Mobilná fáza obsahovala acetonitril a okyslenú demineralizovanú vodu v pomere 29:71 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola zmenená na $0,28 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola nastavená na 50°C .

Separácia č. 10

Okyslená demineralizovaná voda v mobilnej fáze bola nahradená acetátovým pufrom. Pomer acetonitrilu a acetátového pufru bol 29:71 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy zostala $0,28 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola stále nastavená na 50°C .

3.2.4 Zmena teploty separácie

Separácia č. 11

V nasledujúcej separácii bol zisťovaný vplyv teploty vyhrievania kolóny na separáciu kyseliny benzoovej, kyseliny sorbovej, stéviozidu a rebaudiozidu A. Pomer zložiek mobilnej

fázy ostal rovnaký, teda 29:71 v/v (acetonitril a acetátový pufor). Rýchlosť toku mobilnej fázy bola $0,28 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota vyhrievania kolóny bola menená v poradí 40°C , 45°C a 50°C .

3.3 Validácia zvolenej metódy

Validácia analytickej metódy je séria experimentov, vďaka ktorým sa zistia najdôležitejšie charakteristiky danej metódy a potvrdí sa, že poskytuje opakovateľné a spoľahlivé výsledky. V tejto diplomovej práci bola uskutočnená za podmienok uvedených v separácii č. 10.

Účinnosť chromatografickej kolóny (počet poschodí) N

Tento parameter udáva, ako veľmi sa zóny separovaných látok na kolóne rozširujú. Analyzovaný bol roztok zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A. Počet poschodí N bol vypočítaný pomocou Empower Software.

Rozlíšenie R

Parameter rozlíšenie udáva, či je rozdelenie látok dokonalé alebo nedokonalé. Charakterizuje mieru relatívnej separácie, prípadne mieru vzájomného prekrytia susedných píkovo. Pre túto analýzu bol použitý roztok zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A. Rozlíšenie dvoch susedných píkovo R bolo vypočítané pomocou Empower Software.

Opakovateľnosť

Presnosť separácie na používanom prístroji, teda miera zhody medzi jednotlivými výsledkami bola zistená pomocou opakovateľnosti. Bola uskutočnená opakovaným dávkovaním štandardného roztoku rebaudiozidu A s koncentráciou $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a následne i $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Linearita

Linearita znamená, že metóda je schopná poskytovať výsledky, ktoré sú priamo úmerné koncentraciám stanovovanej látky vo vzorke. Tento parameter bol stanovený pomocou kalibračnej krivky. Analyzovaných bolo 5 roztokovo s koncentraciami 5, 10, 25, 50, 75 a $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Linearita nástreku

Sleduje sa závislosť plochy píku zvolenej látky na objeme nástreku. Hoci bol v tejto diplomovej práci využívaný rovnaký objem nástreku ($10 \mu\text{l}$) vo všetkých separáciách, overovaný bol i tento parameter na štandardnom roztoku rebaudiozidu A s koncentraciou $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pričom objem nástreku tohto roztoku bol 4, 5, 7, 9 a $10 \mu\text{l}$.

Citlivosť

Detekčný a kvantitatívny limit (LOD, LOQ)

Detekčný limit je najnižšie detekovateľná koncentrácia látky, nestanovená kvantitatívne. Zisťuje sa ako trojnásobok šumu základnej línie. Kvantitatívny limit je najnižšia koncentrácia látky, stanoviteľná s prijateľnou presnosťou a správnosťou. Určuje sa ako desťnásobok šumu základnej línie. Pre stanovenie týchto limitov sa po dobu 30 minút nechala pretekať kolónou

mobilná fáza, pričom bola zaznamenávaná základná línia. Zo záznamu bol odčítaný maximálny šum v rozmedzí 5 minút.

Selektivita

Je to schopnosť metódy zmerať správne a špecificky stanovovanú látku v prítomnosti iných látok. Selektivita metódy bola potvrdená na reálnych vzorkách.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Experimentálna časť diplomovej práce je zameraná na vývoj metódy pre stanovenie 2 majoritných steviol-glykozidov, stéviozidu a rebaudiozidu A. Zámerom bolo dostatočne oddeliť stéviozid a rebaudiozid A, pričom doba analýzy by nemala byť príliš dlhá. Použité boli 2 typy kratších kolón (dĺžka do 150 mm) a rôzne mobilné fázy s rôznymi pomermi jednotlivých zložiek. Testovaný bol i vplyv teploty na separáciu látok. Následne bola vhodná metóda pre separáciu steviol-glykozidov upravená tak, aby bolo možné stanoviť spolu s nimi v jednej analýze i konzervačné látky, konkrétne kyselinu benzoovú a sorbovú (resp. ich sodné a draselné soli). V tejto kapitole sú popísané výsledky jednotlivých separácií s chromatogramami, tiež validácia metódy a analýza reálnych vzoriek nápojov.

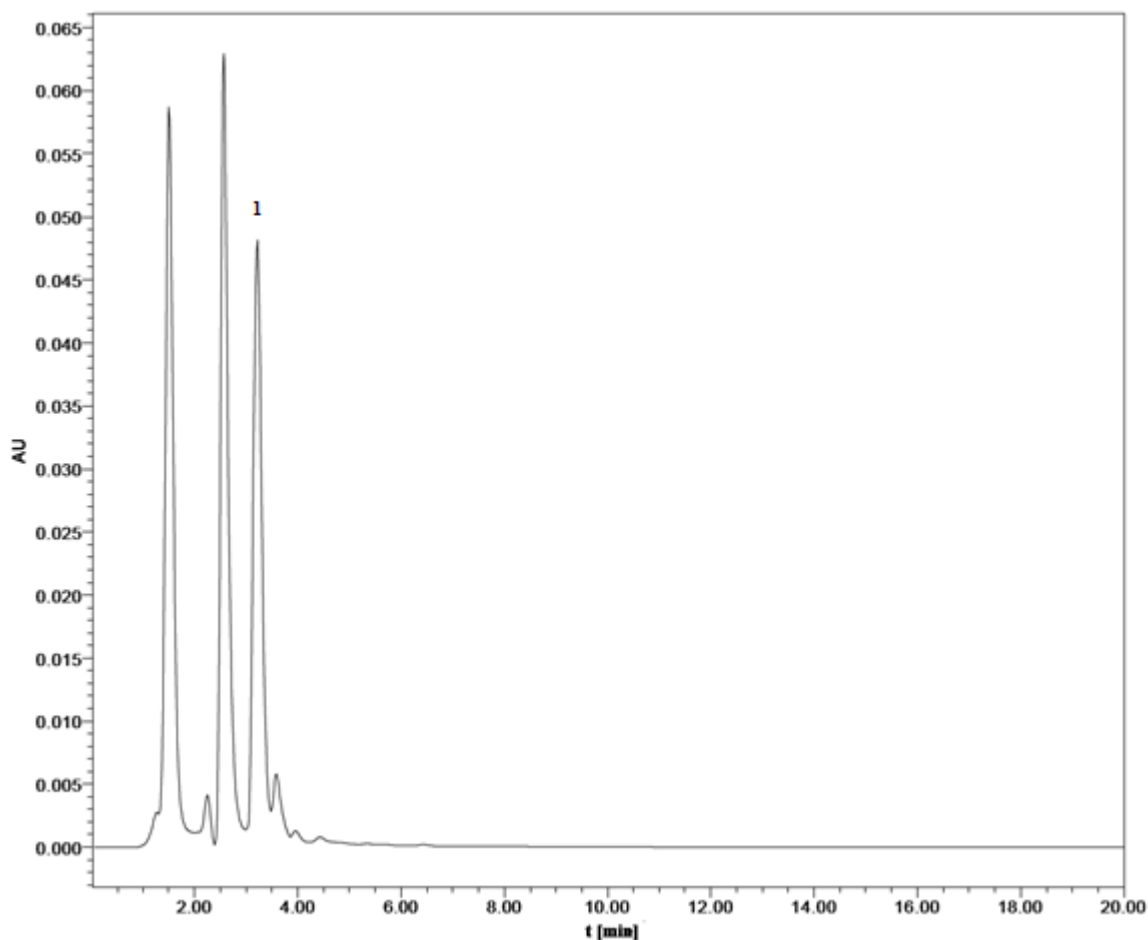
4.1 Separácia stéviozidu a rebaudiozidu A

Prvá oblasť experimentálnej časti sa zaoberá spôsobom oddelenia stéviozidu od rebaudiozidu A v zmesi. Pre zisťovanie vhodnosti zvolených podmienok separácie, teda oddelenia stéviozidu od rebaudiozidu A, bol využívaný roztok z komerčného sladidla *Stevia SILVER 250*, ktorý obsahuje analyzované látky, avšak v neznámom pomere. Chromatogram tejto látky je uvedený v prílohe č. 2. Pík rebaudiozidu A bol identifikovaný HPLC štandardom rebaudiozidu A.

4.1.1 Využitie monolitickej kolóny

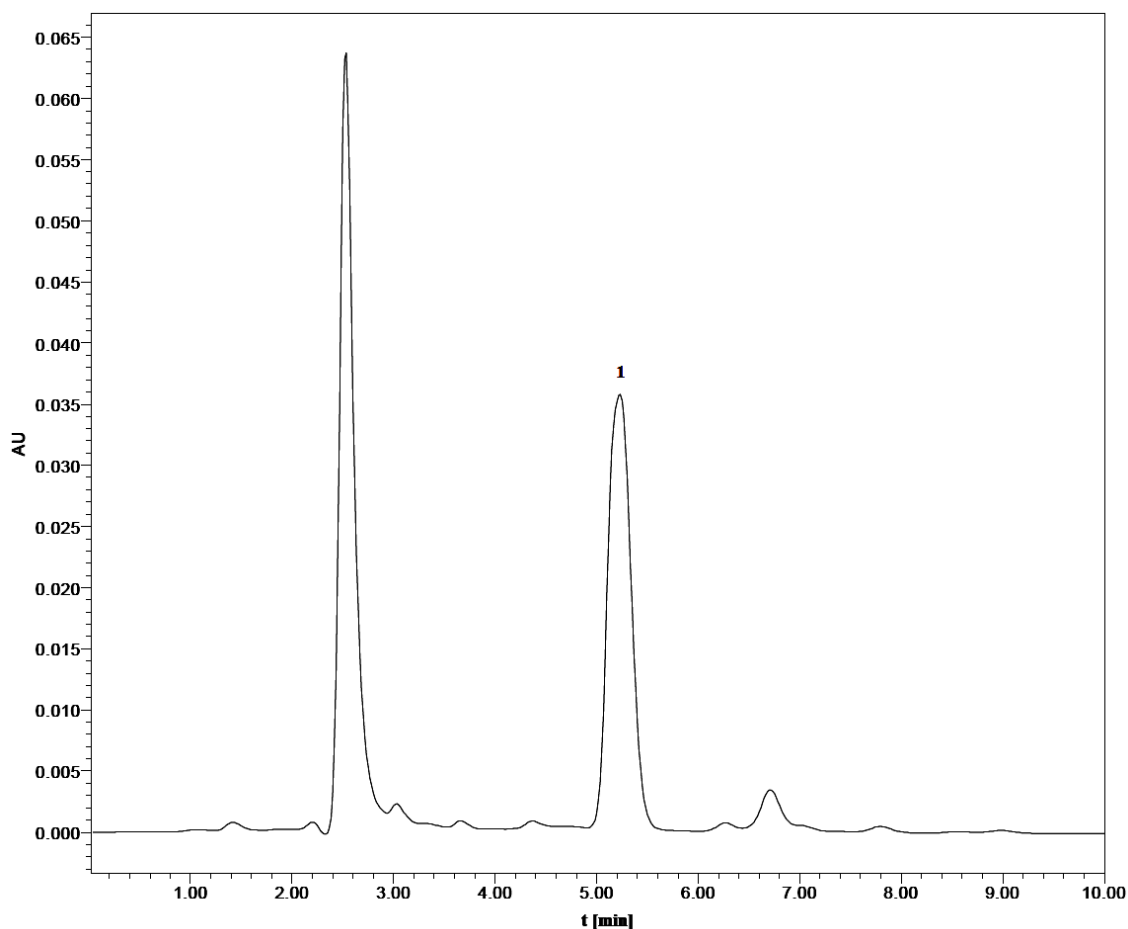
Prvé separácie boli uskutočnené na monolitickej kolóne, pre zistenie vhodnosti tejto kolóny na separáciu stéviozidu a rebaudiozidu A. Pri počiatočnom zložení mobilnej fázy bolo vychádzané z článku [33], pretože v ňom uvedená separácia je rýchla a dostatočne účinná. Tiež obsahuje postup prečistenia vzorky pomocou SPE, čo by bolo vhodné využiť v prípade, že by vzorky nápojov obsahovali priveľa látok, ktoré by na chromatograme boli nežiadané. Podmienky všetkých separácií sú uvedené v kapitole 3.2.

Podľa chromatogramu zo separácie č. 1 (*Obrázok 7*) je vidieť, že zvolené podmienky pre separáciu stéviozidu od rebaudiozidu A neboli vhodné. Na kolóne sa prakticky neseparovali žiadne látky. Preto bol v ďalšej separácii pozmenený pomer zložiek mobilnej fázy.



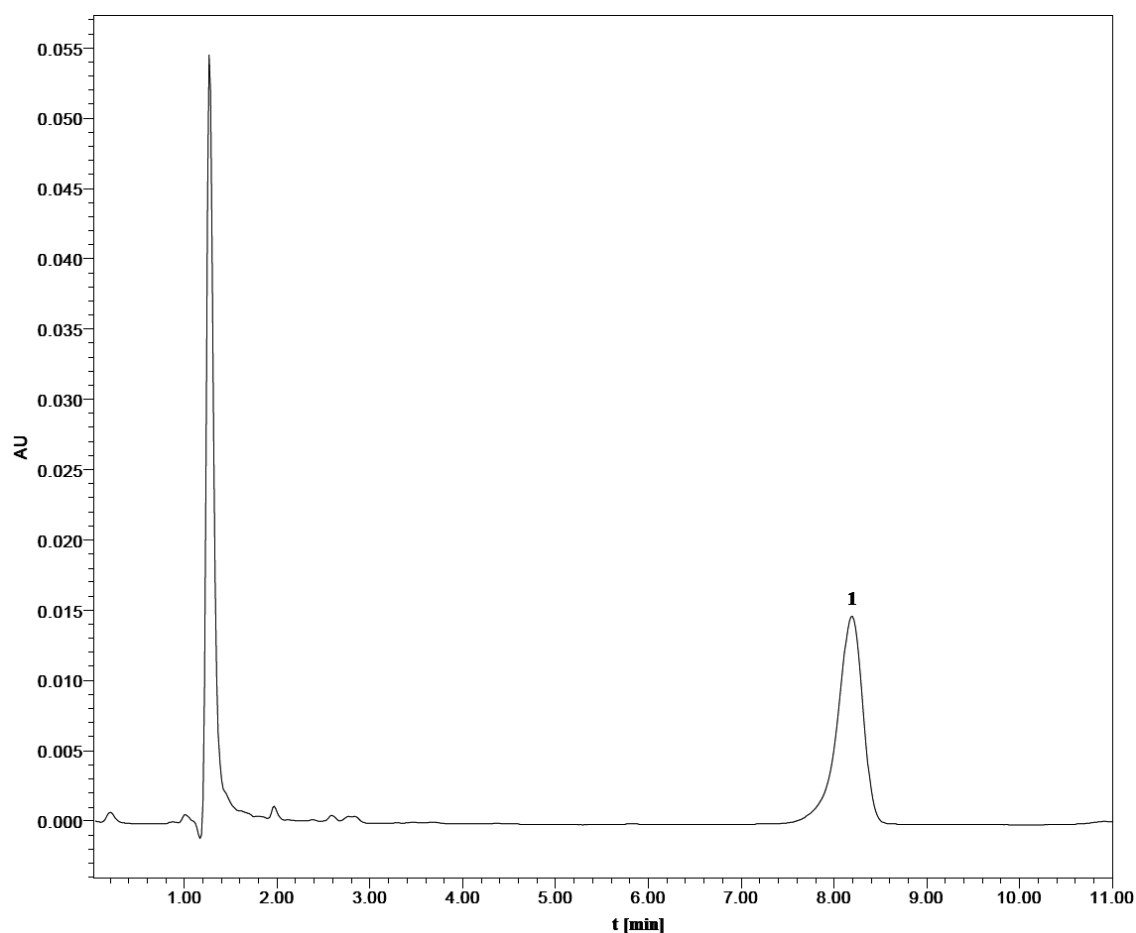
Obrázok 7: Chromatogram zo separácie č. 1. Pík: 1 zmes stéviozidu a rebaudiozidu A

Zmenou pomeru zložiek mobilnej fázy z 35:65 v/v na 30:70 v/v, teda znížením obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze, sa predĺžil retenčný čas píku 1 (Obrázok 8). Tým sa zvýšila afinita analyzovaných látok k stacionárnej fáze, takže boli dlhšie zadržiavané na kolóne. Avšak separácia sa nezlepšila, pretože stéviozid i rebaudiozid A majú spoločný jeden pík.



Obrázok 8: Chromatogram zo separácie č. 2. Pík: 1 zmes stéviozidu a rebaudiozidu A

Keďže v predchádzajúcej separácii nedošlo k oddeleniu stéviozidu od rebaudiozidu A, v separácii č. 3 bol pomer zložiek mobilnej fázy opäť zmenený. V mobilnej fáze bol znovu znížený obsah acetonitrilu, teda pomer zložiek bol 25:75 v/v. Z chromatogramu (Obrázok 9) je však vidieť, že znižovaním podielu acetonitrilu v mobilnej fáze sa stéviozid a rebaudiozid A od seba neoddeľujú, ale zvyšuje sa ich spoločný retenčný čas.



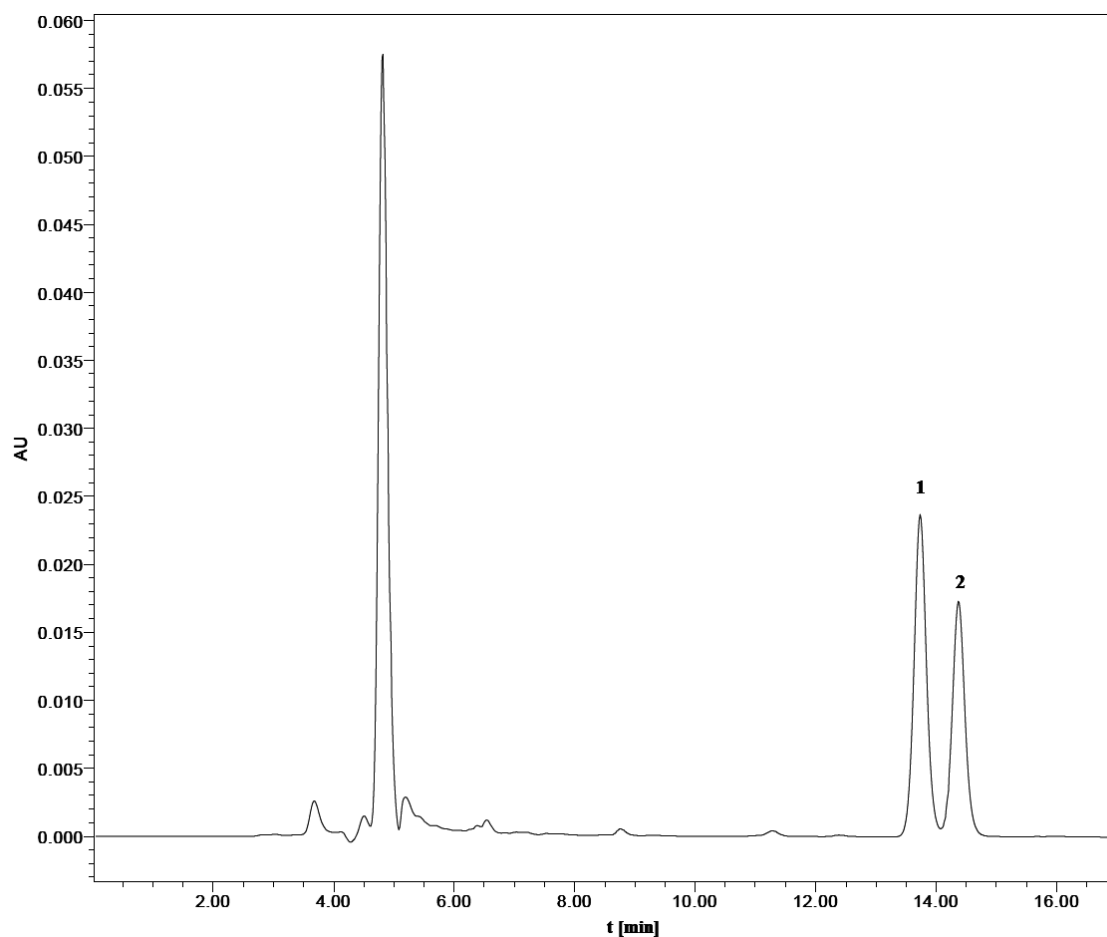
Obrázok 9: Chromatogram zo separácie č. 3. Pík: 1 zmes stéviozidu a rebaudiozidu A

Vzhľadom na doterajšie výsledky je zrejmé, že monolitická kolóna nie je vhodná pre separáciu steviol-glykozidov pri použití mobilnej fázy tvorenej acetonitrilom a okyslenou demineralizovanou vodou (pH 2,75). Preto v nasledujúcich separáciách bola využitá iná (dlhšia) kolóna.

4.1.2 Využitie kolóny Ascentis Express C18

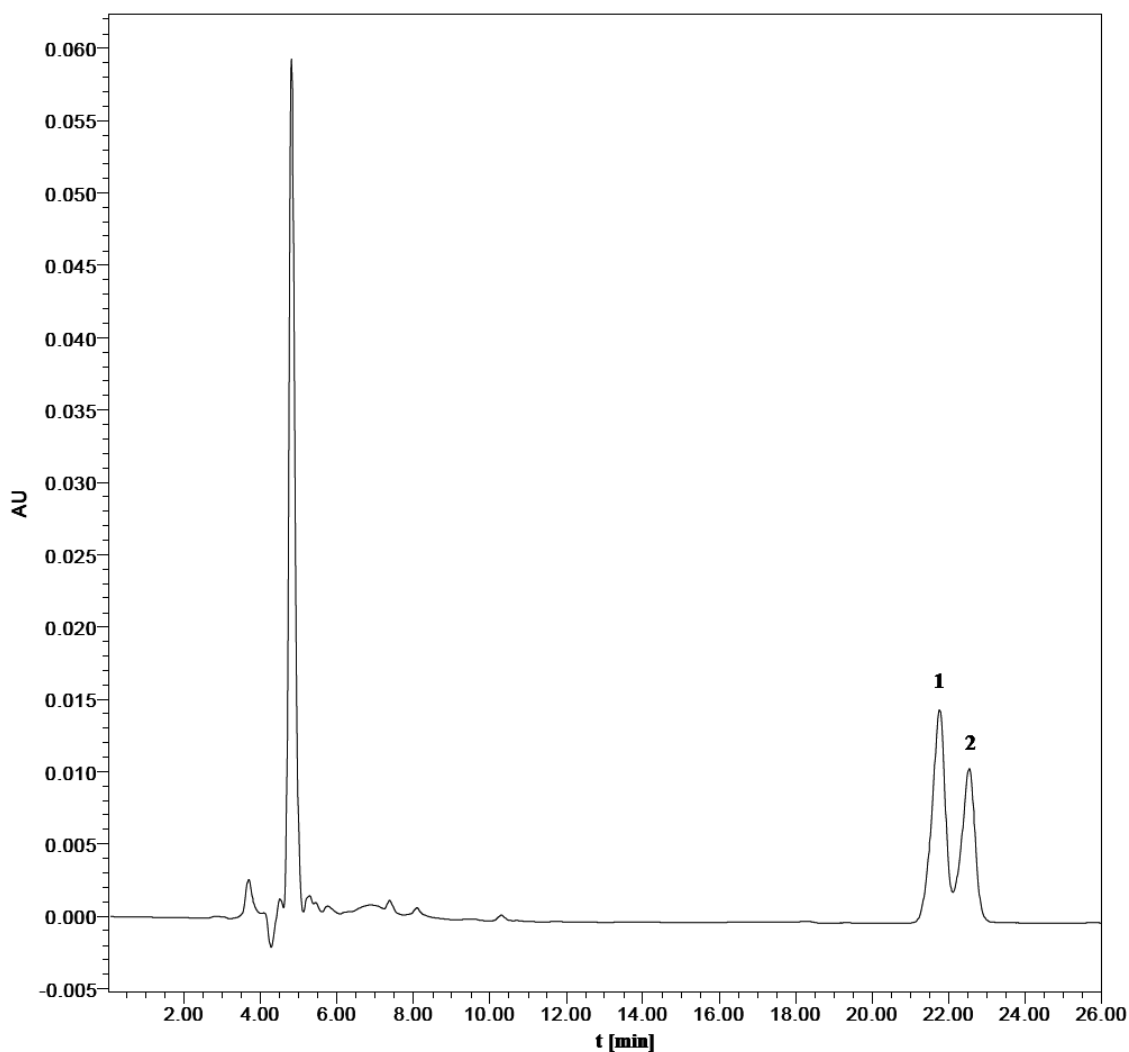
Vo všetkých nasledujúcich separáciách bola monolitická kolóna nahradená kolónou Ascentis Express C18. Nová kolóna nie je monolitická, na rozdiel od predchádzajúcej je o 50 mm dlhšia a má pevné, neporézne jadro. Keďže pre túto kolónu sú vhodnejšie vyššie teploty separácie, na začiatku bol termostat pre kolónu nastavený na 40 °C.

Aj na tejto kolóne boli pre delenie látok využité viaceré mobilné fázy. Prvá analýza (separácia č. 4) bola uskutočnená s mobilnou fázou zloženou z acetonitrilu a okyslenej demineralizovanej vody v pomere 30:70 v/v. Výsledkom tejto separácie je chromatogram (Obrázok 10), na ktorom je vidieť, že stéviozid a rebaudiozid A zo zmesi sa rozdelili. Pre vyššie rozlíšenie píkov však boli uskutočnené i ďalšie separácie s odlišným pomerom zložiek mobilnej fázy.



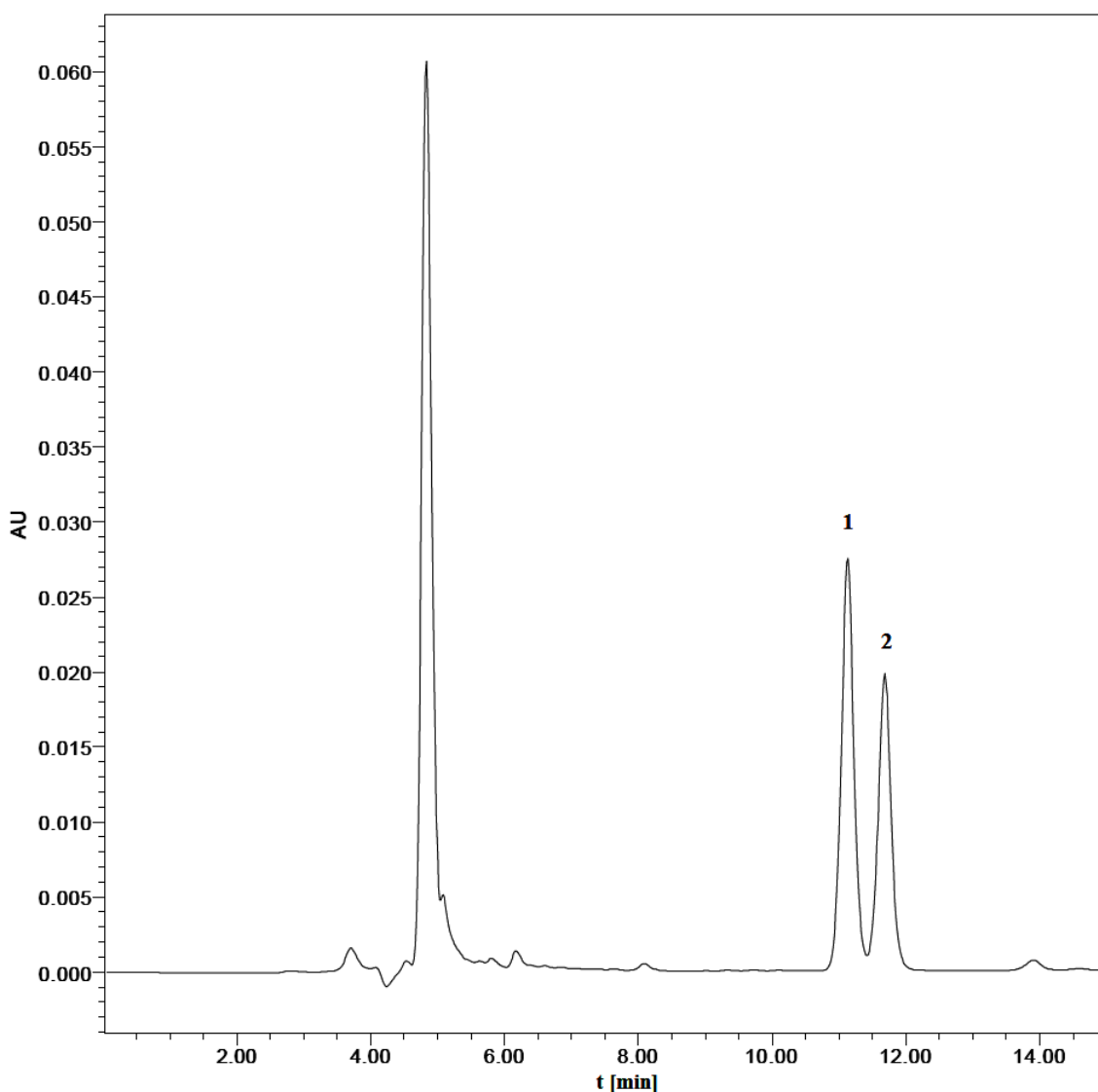
Obrázok 10: Chromatogram zo separácie č.4. Píky: 1 rebaudiozid A, 2 stéviozid.

V nasledujúcej separácii bol znížený obsah acetonitrilu v mobilnej fáze a to z 30:70 v/v na 27:73 v/v. Analyzované látky boli na kolóne zadržiavané dlhšie, čo spôsobilo horšie rozlíšenie medzi píkom rebaudiozidu A a stéviozidu (Obrázok 11). V ďalšej separácii bol preto zvýšený obsah acetonitrilu v mobilnej fáze, čím sa separácia urýchlila.



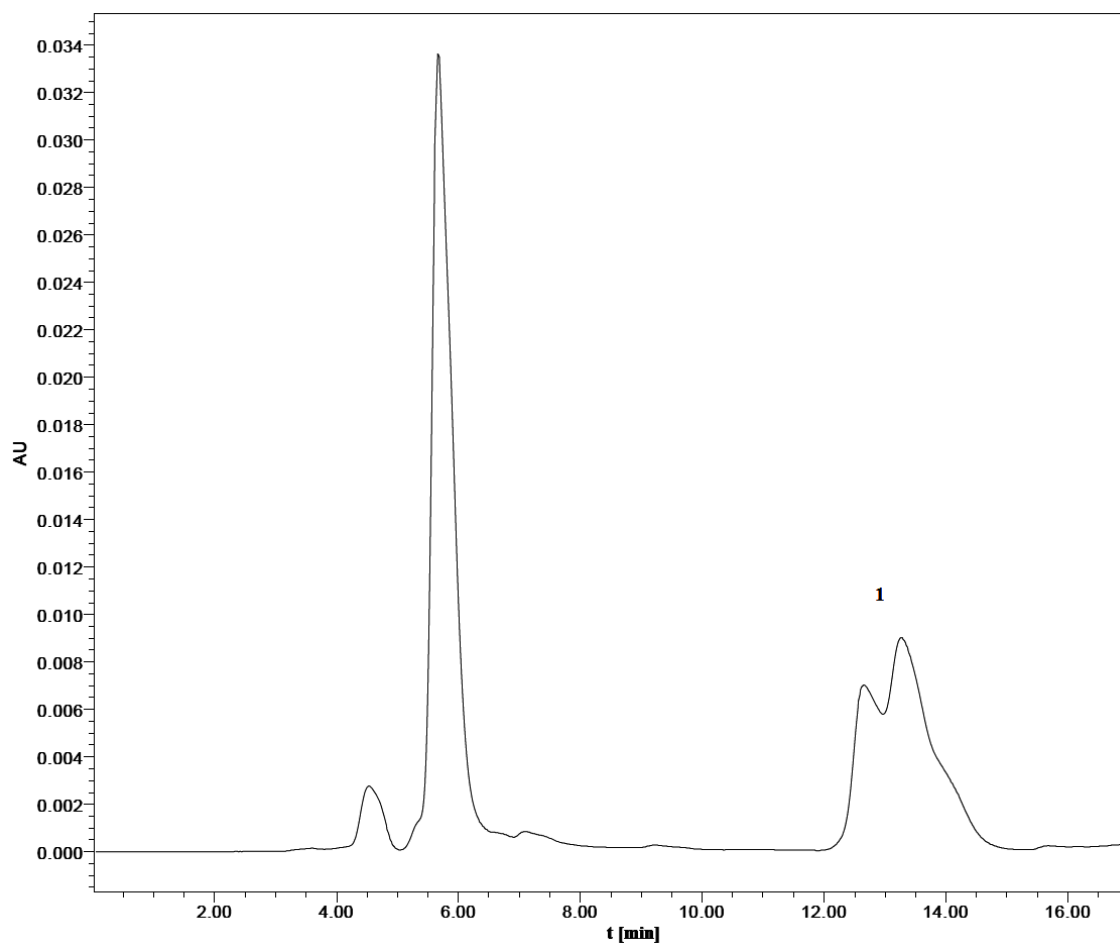
Obrázok 11: Chromatogram zo separácie č. 5. Píky: 1 rebaudiozid A, 2 stéviozid.

Na chromatograme zo separácie č. 6 (Obrázok 12) je vidieť, že rozlíšenie píkov analyzovaných látok je dostatočné ($R = 1,6$). V tejto separácii bol pomer zložiek mobilnej fázy zmenený z 27:73 v/v na 31:69 v/v. Ďalším zvýšením obsahu acetonitrilu v mobilnej fáze by bolo možné dosiahnuť ešte lepšie rozlíšenie pík, avšak ich retenčné časy by boli príliš nízke a v prípade analýzy reálnych vzoriek nápojov by mohli byť píky stanovovaných látok prekryté píkmi iných látok.



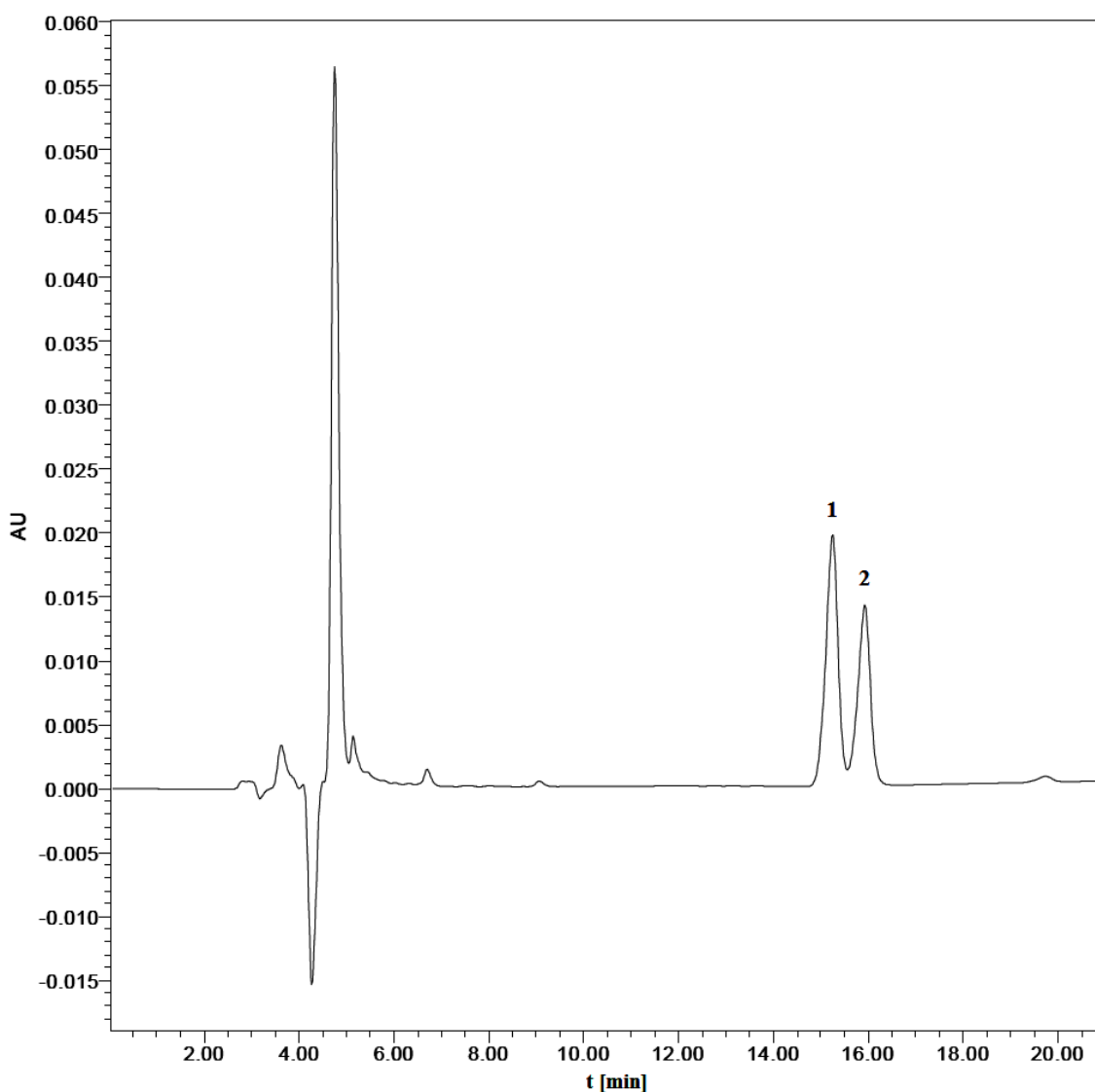
Obrázok 12: Chromatogram zo separácie č. 6. Píky: 1 rebaudiozid A, 2 stéviozid

Pre zvýšenie životnosti kolóny sa využíva predkolóna, ktorá sa nasadí pred používanú kolónu. Tým sa mierne zvýši i retenčný čas separovaných látok. V tomto prípade bola použitá predkolóna MetaGuard C 18. Zloženie mobilnej fázy ostalo rovnaké ako v predchádzajúcej separácii, teda 31:69 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda). Predkolóna separáciu látok zhoršila, pretože steviol-glykozidy sa z kolóny eluovali pomalšie a ich píky na chromatograme (Obrázok 13) sú prekryté. Spojenie tejto predkolóny s používanou kolónou preto nie je vhodné. Zrejme by bolo treba použiť vhodnú predkolónu tiež s pevným jadrom.



Obrázok 13: Chromatogram zo separácie č. 7. Pík 1: zmes rebaudiozidu A a stéviozidu

Pre stanovenie steviol-glykozidov v reálnych vzorkách bola využitá mobilná fáza so zložením 29:71 v/v (acetonitril a okyslená demineralizovaná voda) ako je popísané v postupe pre separáciu č. 8. Rozlíšenie pík stéviozidu a rebaudiozidu A na chromatograme (Obrázok 14) je síce horšie ($R = 1,4$) ako pri podmienkach separácie č. 6 (Obrázok 12), avšak retenčný čas je dlhší. Je teda menšia pravdepodobnosť, že sa píky stanovovaných látok znehodnotia alebo prekryjú nečistotami z reálnych vzoriek. Separácia č. 8 je teda dostatočne vhodná, pre stanovovanie stéviozidu a rebaudiozidu A v reálnych vzorkách nápojov. Ďalšou oblasťou experimentálnej časti bolo otestovať alebo upraviť túto metódu, aby bolo možné stanoviť spolu so steviol-glykozidmi i niektoré konzervačné látky.

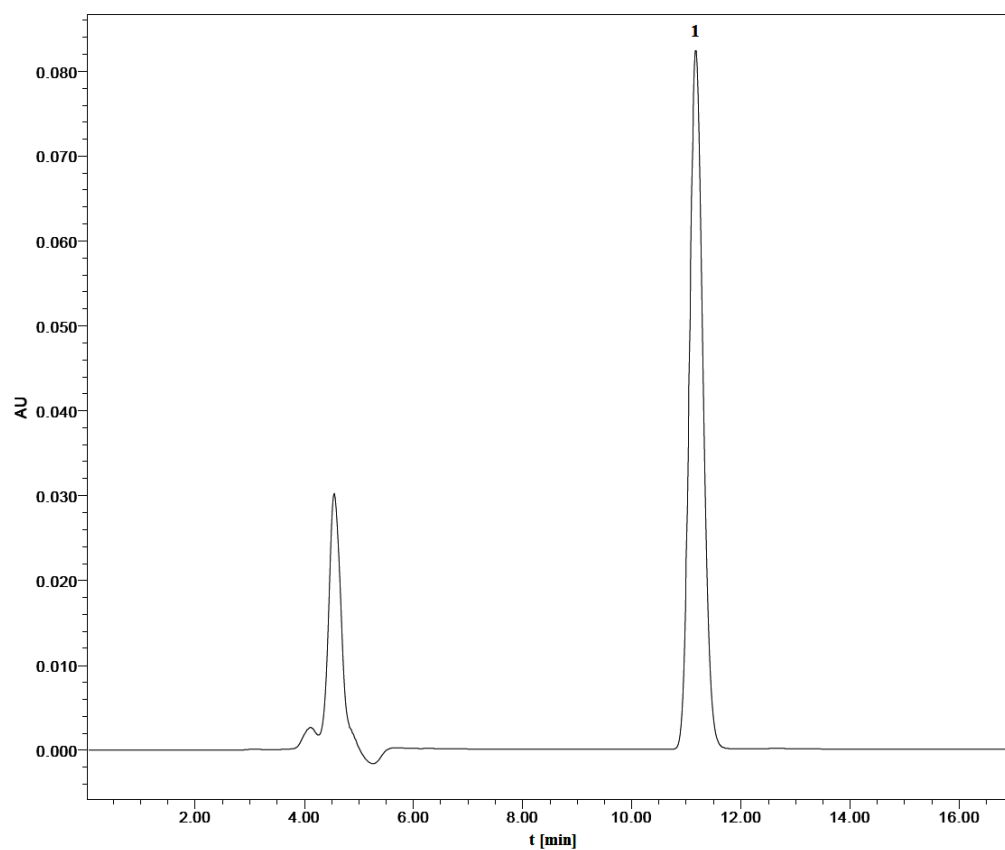


Obrázok 14: Chromatogram zo separácie č. 8. Píky: 1 rebaudiozid A, 2 stéviozid

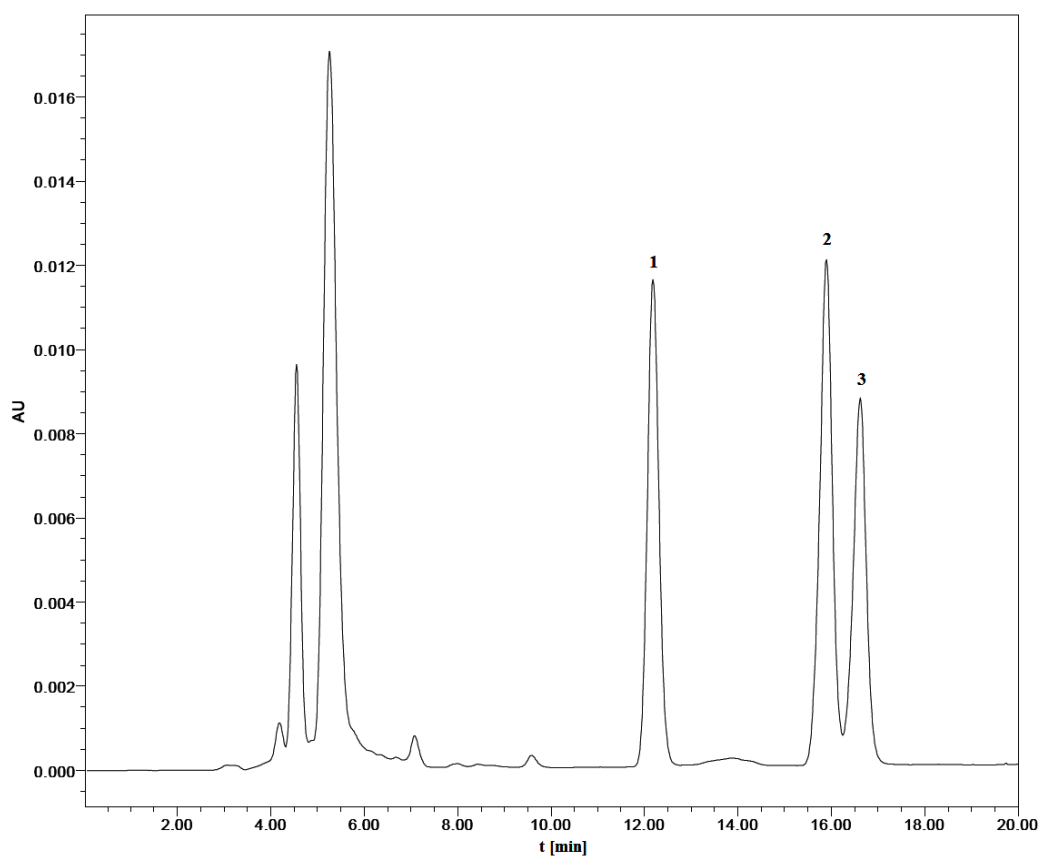
4.1.3 Prídavok konzervačných látok a ich separácia

Okrem steviol-glykozidov sa v nápojoch často vyskytujú i konzervačné látky, preto sa ďalšia oblasť experimentálnej časti zaoberá upravením vyvinutej metódy pre separáciu stéviozidu a rebaudiozidu A tak, aby bolo možné v jednej analýze stanoviť i množstvo zvolených konzervačných látok. Najčastejšie sa využíva kyselina benzoová a sorbová (prípadne ich sodné alebo draselné soli), preto je analýza zameraná práve na ne.

V separácií č. 9 bolo testované rozdelenie kyseliny benzoovej od kyseliny sorbovej pri podmienkach zo separácie č. 8. Z výsledných chromatogramov analýzy vzorky zmesi kyseliny benzoovej a sorbovej (Obrázok 15) a vzorky zmesi obsahujúcej tieto kyseliny, stéviozid i rebaudiozid A (Obrázok 16) je vidieť, že táto mobilná fáza pre separáciu daných konzervačných látok nie je vhodná, pretože kyseliny sa od seba neoddelili. Pre nasledujúcu analýzu bola preto zvolená iná mobilná fáza.



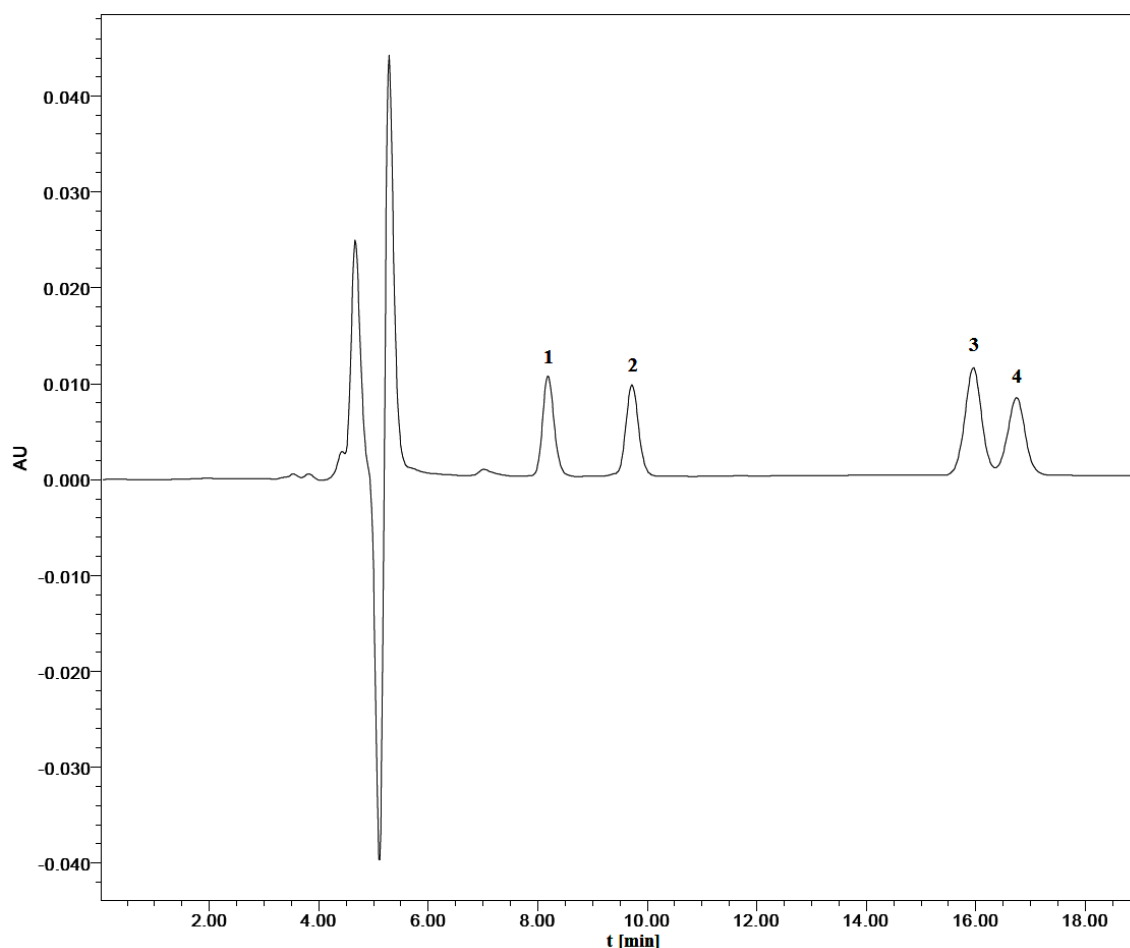
Obrázok 15: Chromatogram zo separácie č. 9. Pík 1: zmes kyseliny benzoovej a sorbovej.



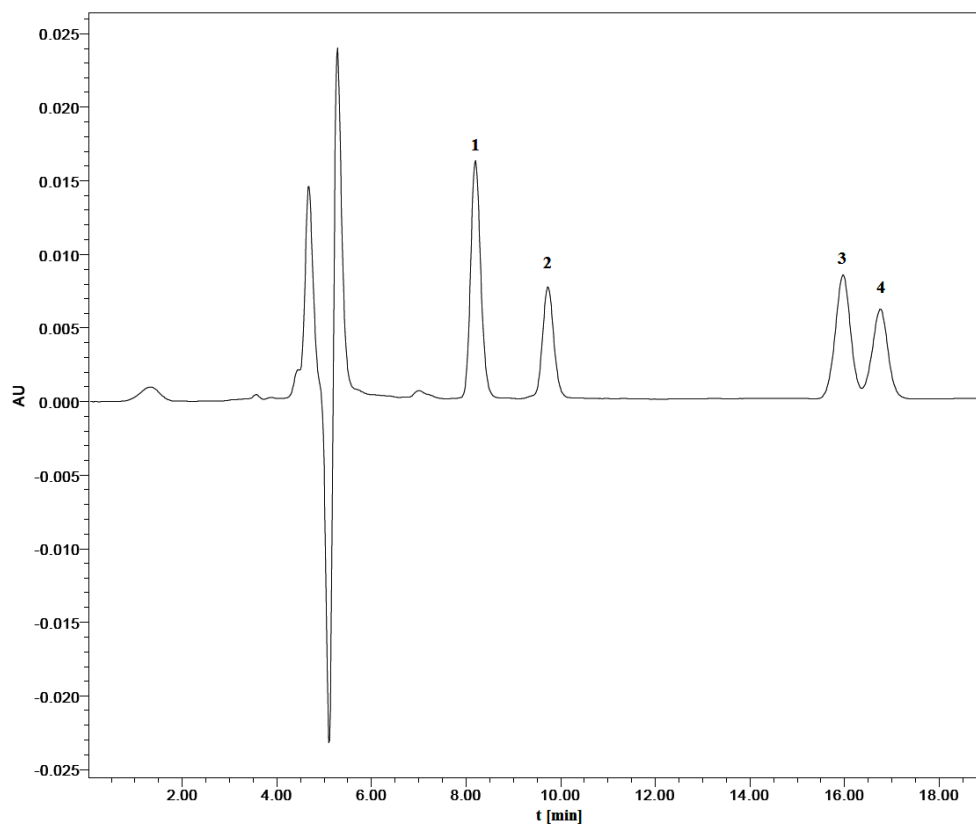
Obrázok 16: Chromatogram zo separácie č. 9. Píky: 1 zmes kyseliny benzoovej a sorbovej, 2 rebaudiozid A, 3 stéviozid

V mobilnej fáze separácie č. 10 bola okyslená demineralizovaná voda nahradená acetátovým pufrom pripraveným podľa postupu uvedenom v kapitole 3.1.5. Testovaná vzorka obsahovala zmes stéviozidu a rebaudiozidu A s prídavkom kyseliny benzoovej a sorbovej. Nasledujúci chromatogram (Obrázok 17) popisuje rozdelenie všetkých látok, ktoré boli vo vzorke.

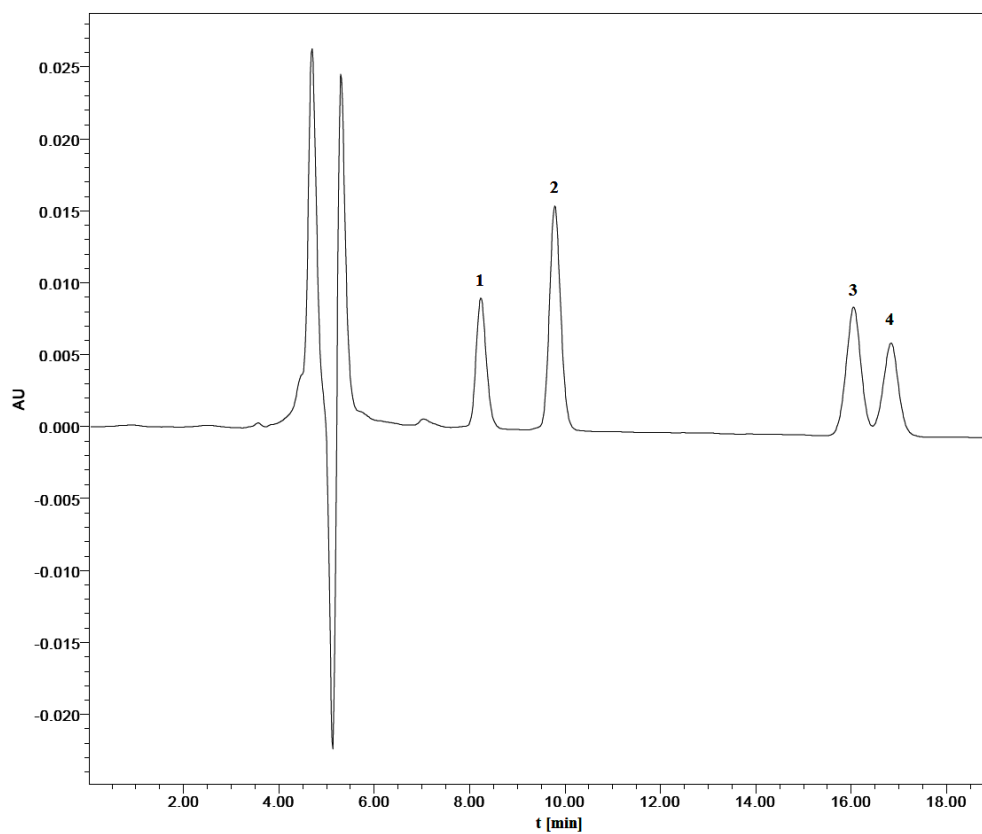
Ďalšie chromatogramy (Obrázok 18, 20 a Obrázok 20) sú uvedené pre prehľadnosť, pretože v každom z analyzovaných vzoriek bola zvýšená koncentrácia jednej zo stanovovaných látok.



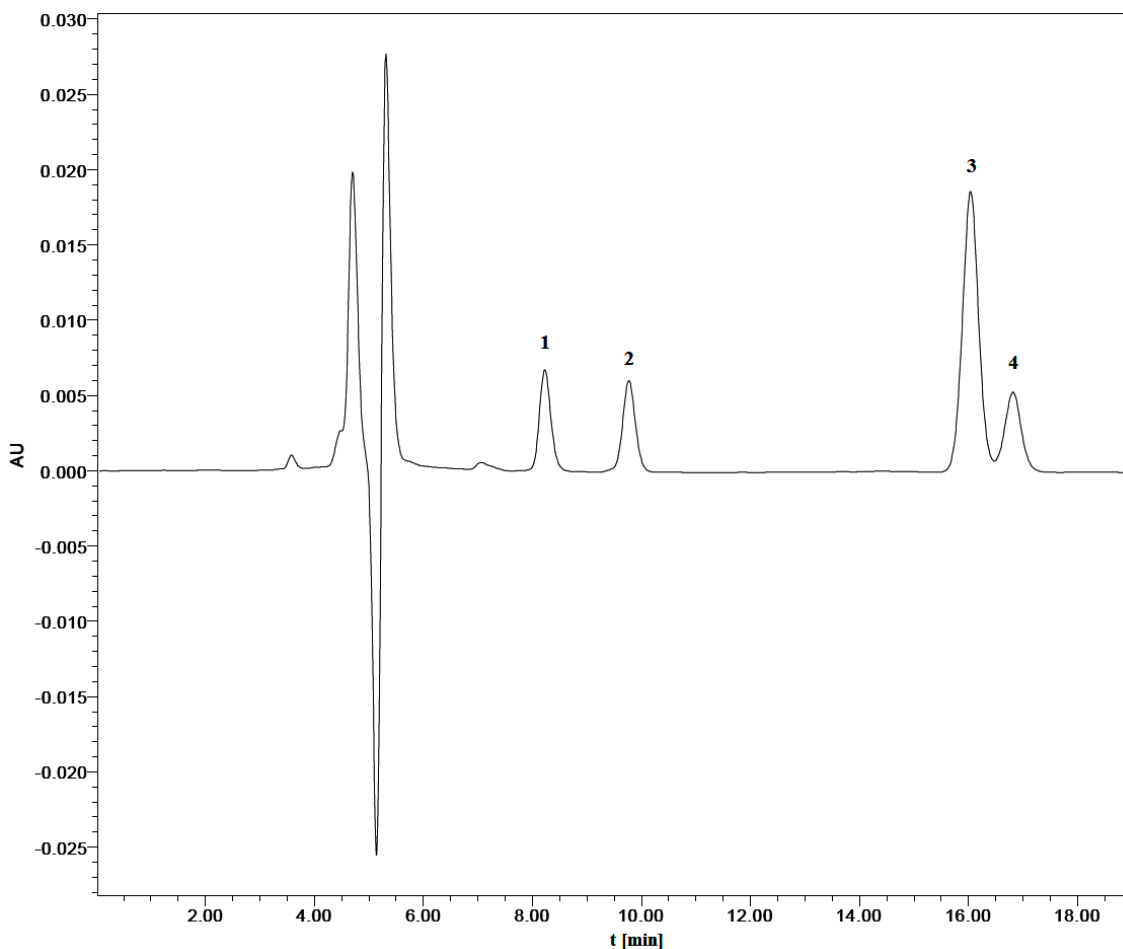
Obrázok 17: Chromatogram zo separácie č. 10. Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid



Obrázok 18: Chromatogram zo separácie č. 10 s dvojnásobnou koncentráciou kyseliny benzoovej.
Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid.



Obrázok 19: Chromatogram zo separácie č. 10 s dvojnásobnou koncentráciou kyseliny sorbovej.
Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid.



Obrázok 20: Chromatogram zo separácie č. 10 s dvojnásobnou koncentráciou rebaudiozidu A.
Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid

4.1.4 Zmena teploty separácie

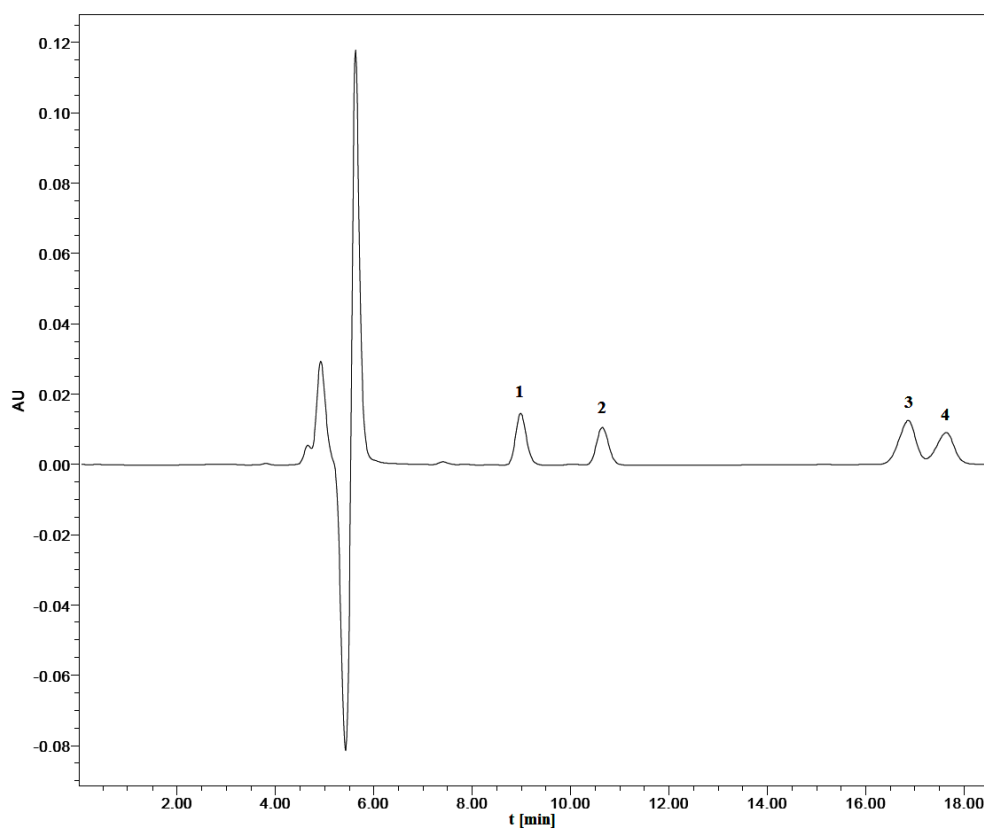
Separácia č. 11 bola zameraná na zistenie vplyvu teploty na separáciu analyzovaných látok. Z tabuľky 5 je vidieť, že zvyšovaním teploty dochádzalo k lepšiemu rozlíšeniu pík stéviozidu a rebaudiozidu A. Z tejto tabuľky tiež vyplýva, že zvyšovaním teploty na termostate kolóny sa analýza látok urýchlila, pretože s rastúcou teplotou sa retenčné časy znižujú.

Pre prehľadnosť sú uvedené i chromatogramy z jednotlivých separácií pri teplotách 40, 45 a 50 °C (Obrázok 21, Obrázok 22 a Obrázok 23).

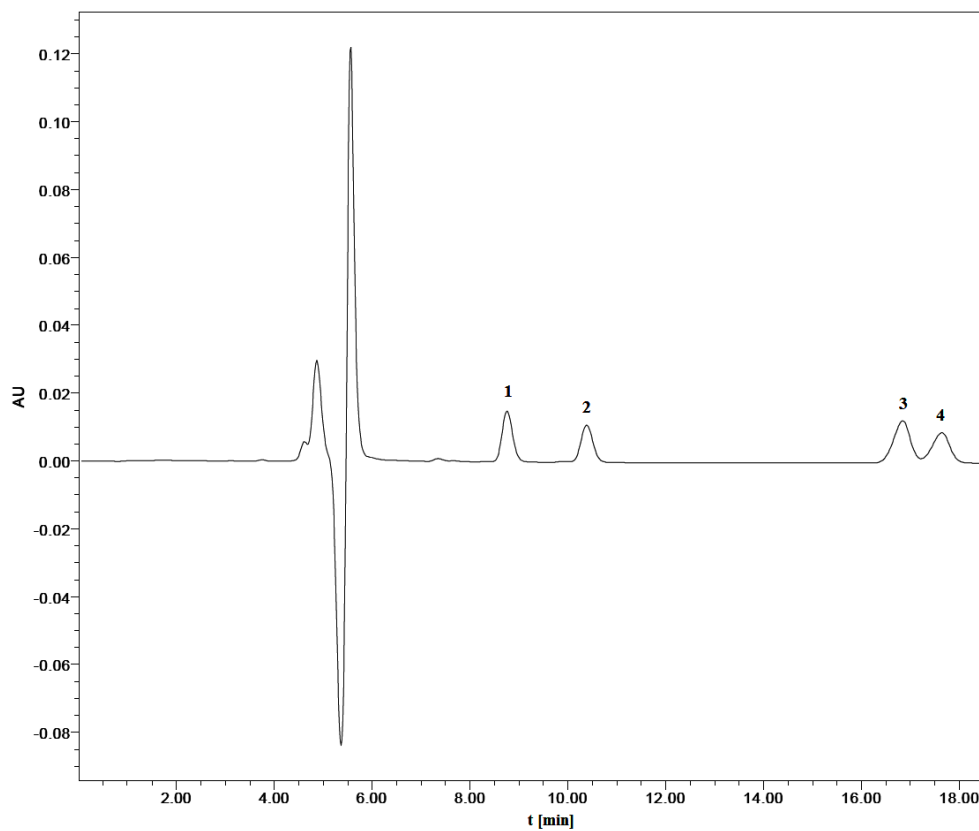
Tabuľka 5: Vplyv teploty na separáciu

Teplota	Retenčný čas [min]				Rozlíšenie
	k. benzoová	k. sorbová	rebaudiozid A	stéviozid	
40 °C	8,99	10,64	16,86	17,63	1,18
45 °C	8,76	10,38	16,82	17,63	1,26
50 °C	8,53	10,13	16,77	17,59	1,38

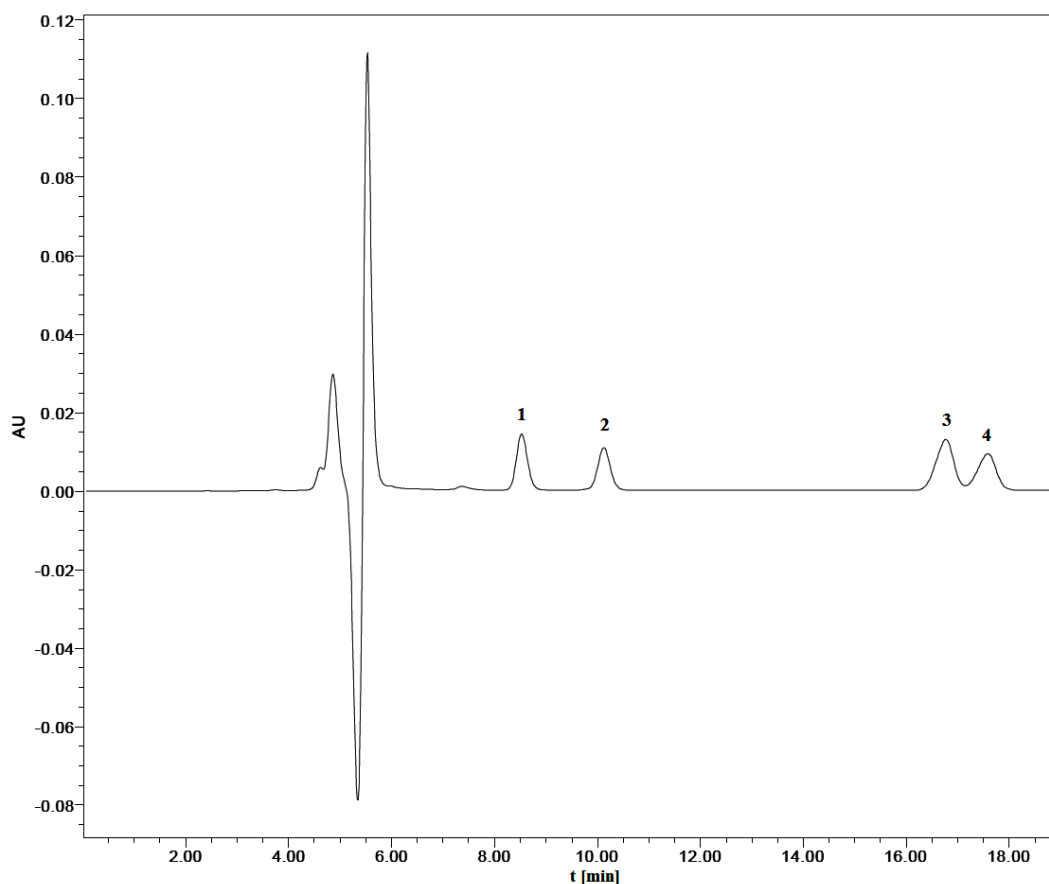
Pozn.: rozlíšenie je uvedené pre pík rebaudiozidu A a stéviozidu.



Obrázok 21: Chromatogram zo separácie č. 11, teplota 40 °C. Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid



Obrázok 22: Chromatogram zo separácie č. 11, teplota 45 °C. Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid



Obrázok 23: Chromatogram zo separácie č. 11, teplota 50 °C. Píky: 1 kyselina benzoová, 2 kyselina sorbová, 3 rebaudiozid A, 4 stéviozid

4.2 Validácia vyvinutej metódy

Ako najvhodnejšia metóda bola zvolená separácia č. 10, pomocou ktorej boli dostatočne oddelené oba stanovované steviol-glykozidy i obe konzervačné látky. Pre túto separáciu bola použitá mobilná fáza zložená z acetonitrilu a acetátového pufru 29:71 v/v. Rýchlosť jej toku bola nastavená na $0,28 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a použitá kolóna Ascentis Express C18 bola vyhrievaná na teplotu 50 °C.

Validácia metódy je uvedená za týchto podmienok separácie.

Účinnosť chromatografickej kolóny (počet teoretických poschodí) N

Analyzovaný bol roztok zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A. Počet teoretických poschodí N bol vypočítaný pomocou Empower Software.

Analyzovaná látka	Počet poschodí N
rebaudiozid A	12 300
stéviozid	12 627

Čím je počet teoretických poschodí na kolóne vyšší, tým je aj jej účinnosť vyššia.

Rozlíšenie R

Rozlíšenie susedných píkav rebaudiozidu A a stéviozidu je $R = 1,4$. Podľa literatúra sa za požadované rozlíšenie považuje $R > 1,5$. To znamená, že rozlíšenie nie je dostatočné a oddelenie píkav nesiahá až po základnú líniu. Dokonalé rozlíšenie by bolo možné dosiahnuť v prípade, že by mobilná fáza obsahovala viac acetonitrilu. Tým by sa však znížil retenčný čas a separované látky by bolo vhodnejšie prečistiť, pretože inak by sa veľmi zvýšila pravdepodobnosť pohltienia mŕtvym objemom alebo prekrytím stanovovaných látok inými látkami. Tiež by nebolo možné stanoviť súčasne so stéviozidom a rebaudiozidom A i zvolené konzervačné látky, kyselinu benzoovú a sorbovú. Rozlíšenie $R = 1,4$ je však dostačujúce pre to, aby plochy píkav boli spoľahlivo vyhodnotené každým HPLC softwarom.

Opakovateľnosť

Opakovane bol dávkovaný roztok rebaudiozidu A, najskôr s koncentráciou $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, a potom s koncentráciou $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledky pre obe koncentrácie sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6: Opakovateľnosť analýzy

$c = 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ č. merania	Retenčný čas [min.]	Plocha píku [mV·s]	$c = 50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ č. merania	Retenčný čas [min.]	Plocha píku [mV·s]
1.	16,73	66,9	1.	16,77	364,8
2.	16,74	66,0	2.	16,75	363,8
3.	16,79	65,2	3.	16,78	361,7
4.	16,72	66,3	4.	16,72	368,8
5.	16,70	65,3	5.	16,72	368,1
Smerodajná odchýlka	0,03	0,6	Smerodajná odchýlka	0,02	2,7
Priemer	16,74	65,9	Priemer	16,75	365,4
Odchýlka [%]	0,17	0,9	Odchýlka [%]	0,15	0,7

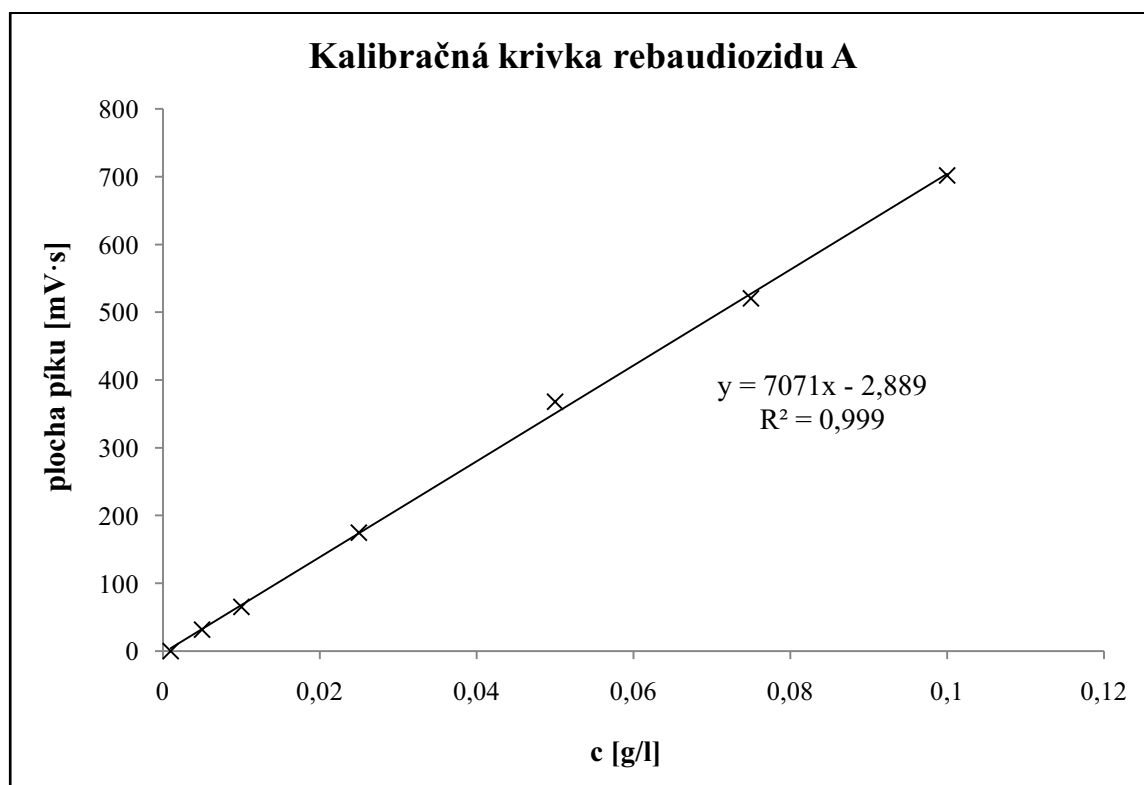
Smerodajná odchýlka pri oboch koncentráciách štandardného roztoku rebaudiozidu A pre retenčný čas i plochu píku je menšia ako 1 %. Z toho vyplýva, že zvolená metóda je opakovateľná.

Linearita

Analyzovaných bolo 5 roztokov štandardu rebaudiozidu A s koncentraciami: 5, 10, 25, 50, 75 a $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledné hodnoty plôch píkav s príslušnou koncentráciou sú uvedené v tabuľke 6. Zostrojením závislosti plôch píkav na koncentrácií rebaudiozidu A (graf 4) bola zistená regresná rovnica i korelačný koeficient, vďaka tomu bolo možné posúdiť linearitu tejto metódy. Tabuľka i graf sú uvedené na nasledujúcej strane.

Tabuľka 7: Linearita zvolenej metódy

Koncentrácia [g·l ⁻¹]	Plocha píku [mV·s]
0,005	31,8
0,010	65,3
0,025	174,5
0,050	367,8
0,075	580,0
0,100	701,5



Graf 4: Závislosť plochy píku na koncentrácii rebaudiozidu A

Rovnica regresnej priamky: $y = 7071x - 2,889$

Koeficient korelácie: 0,9991

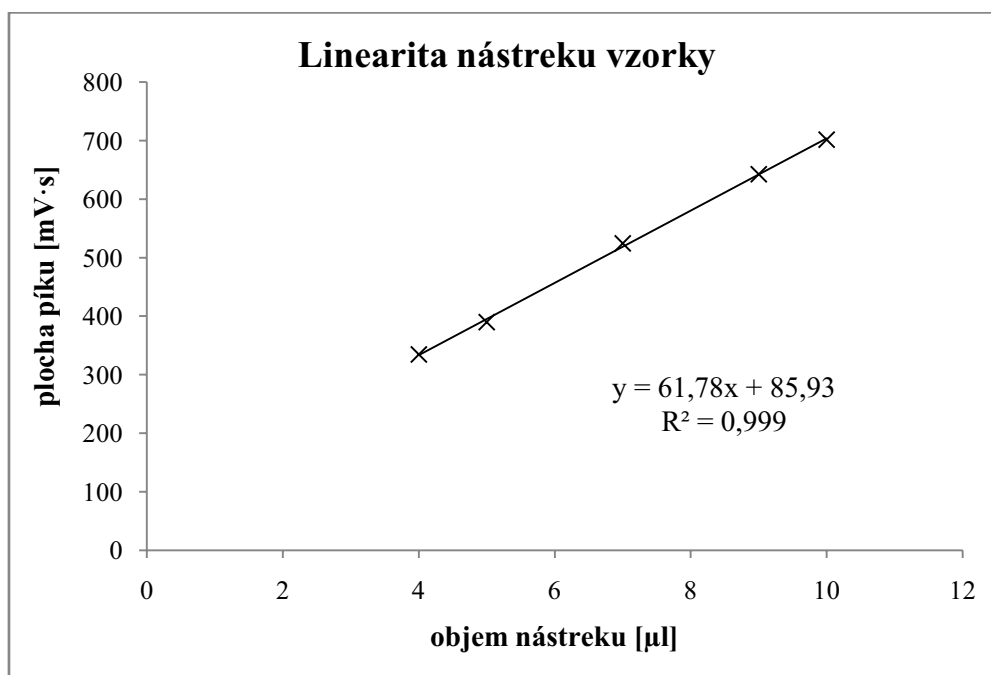
Získaný korelačný koeficient potvrdzuje linearitu metódy.

Linearita nástreku

Nastreknutím rôznych objemov (4, 5, 7, 9 a 10 µl) štandardu rebaudiozidu A s koncentráciou 0,1 g·l⁻¹ boli získané hodnoty plôch pík, ktoré boli zapísané do tabuľky 8 a vynesené do grafu 5. Prostredníctvom tohto grafu bola zistená rovnica regresnej priamky a korelačný koeficient, vďaka ktorému bolo možné posúdiť linearitu nástreku.

Tabuľka 8: Linearita nástreku vzorky

Objem nástreku [μl]	Plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}$]
4	334,4
5	389,8
7	524,0
9	642,3
10	701,5



Graf 5: Závislosť plochy píku na objeme nástreku vzorky

Rovnica regresnej priamky: $y = 61,781x + 85,935$

Koeficient korelácie: 0,9994

Predpoklad linearity nástrekového objemu je platný v prípade, ak korelačný koeficient je väčší alebo rovný 0,999. Získaný korelačný koeficient teda potvrdzuje linearitu objemu nástreku.

Citlivosť

Šum základnej línie: $1,6 \cdot 10^{-4}$.

LOD: $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

LOQ: $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Limit detekcie ukazuje, že na chromatograme je možné rozlíšiť chemické látky s koncentráciou vyššou ako $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Spoľahlivo kvantifikovať tieto látky je možné až od koncentrácie $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Selektivita

Selektivita zvolenej metódy bola potvrdená na reálnych vzorkách nápojov, pretože v nich boli stanovené steviol-glykozidy v prítomnosti iných látok, ktoré sa v nápojoch nachádzali. Chromatogramy reálnych vzoriek sú uvedené v prílohách.

4.3 Analýza reálnych vzoriek nápojov

Nápoje boli analyzované s využitím podmienok separácie č. 10. Bolo v nich kvantifikované množstvo rebaudiozidu A, kyseliny benzoovej a sorbovej. Vo vzorkách bola ďalej určená prítomnosť stéviozidu. Jeho kvantifikácia v nich však nebola možná z dôvodu nedostupnosti štandardu stéviozidu. Na obrázku 25 sú zobrazené nápoje, ktoré boli analyzované.



Obrázok 24: Analyzované nápoje

Obsah rebaudiozidu A v nápojoch bol vypočítaný z kalibračnej krivky (graf 3 v kapitole 4.1.5. a v prílohe č. 3) a obsah kyseliny benzoovej a sorbovej bol vypočítaný z kalibračnej krivky uvedenej v prílohe č. 4. Výsledky analýzy sú uvedené v tabuľke 9. Chromatogramy analyzovaných nápojov sú uvedené v prílohách.

Tabuľka 9: Výsledné koncentrácie stanovovaných látok v nápojoch

nápoj	$c_{\text{reb A}} [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	prítomnosť stéviozidu	$c_{\text{k. benzoová}} [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c_{\text{k. sorbová}} [\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]$
Grena	42,68	nie	91,80	0
Kombajnérka	29,44	nie	91,77	0
Malina	29,14	nie	79,30	0
Zázvorka	45,76	nie	101,43	0
Jupík Multivitamín	45,32	áno	0	0

Obsah rebaudiozidu A i kyseliny benzoovej sa v jednotlivých nápojoch líšil. Kyselina sorbová nebola zistená v žiadnom z analyzovaných nápojov. Etiketa nápojov z Pivovaru Černá hora (Grena, Kombajnérka, Malina a Zázvorka) udáva prítomnosť steviol-glykozidov

a konzervačnej látky benzoanu sodného, ich množstvo však nie je uvedené. V týchto nápojoch sa vyskytuje i fruktóza, ktorá je zastúpená vo väčšom množstve, na čo poukazuje i energetická hodnota. Táto hodnota sa na etiketách jednotlivých nápojov líši.

Nápoj Jupík Multivitamín (Funny fruit) je pasterovaný a neobsahuje kyselinu benzoovú ani sorbovú, čo bolo potvrdené analýzou. Pre osladenie bol použitý glukózo-fruktózový sirup a extrakt zo stévie, preto je na chromatograme vidieť pík stéviozidu i rebaudiozidu A.

Legislatíva uvádza maximálne množstvo kyseliny benzoovej pre konzerváciu nealkoholických nápojov $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, čo splňujú všetky analyzované nápoje. Pre sladenie steviol-glykozidmi je maximálne množstvo $80 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, ktoré tiež nebolo v analyzovaných nápojoch prekročené.

5 ZÁVER

V teoretickej časti tejto diplomovej práce bola popísaná história, botanická charakteristika a pestovanie stévie sladkej. Ďalej sú v nej uvedené i jednotlivé steviol-glykozidy, ktoré spôsobujú sladkú chuť tejto rastliny.

Stévia je prírodný zdroj nekalorických sladkých látok vhodných i pre diabetikov a má i ďalšie pozitívne účinky, napríklad neprispieva k obezite ani k tvorbe zubného kazu a má tiež antimikrobiálne a antioxidačné účinky, záujem o ňu stále narastá.

Keďže steviol-glykozidy sú čoraz častejšie využívané ako neenergetické sladidlo vhodné i pre diabetikov, je možné ich nájsť v mnohých ďalších nápojoch i potravinách. Zoznam potravín, v ktorých sa toto sladidlo pod označením E960 nachádza, je uvedený v kapitole 2.3. Spomínaný zoznam obsahuje 30 potravín. Pre porovnanie, pred 2 rokmi bolo zaznamenaných len 17 potravín s obsahom tohto sladidla [38].

V západoeurópskych krajinách sa extrakty zo stévie využívajú i v kozmetike do pleťových krémov a zubných pást. Je pravdepodobné, že čoskoro sa tieto extrakty začnú vyskytovať i v kozmetických výrobkoch českých a slovenských výrobcov.

Súčasťou teoretickej časti je tiež rešerš o separácii steviol-glykozidov vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou. Z nej bolo vychádzané pri vypracovaní experimentálnej časti. Po posúdení retenčných časov jednotlivých analýz boli zvolené počiatočné podmienky separácie pre túto diplomovú prácu. Následne však boli podmienky postupne upravované tak, aby bola separácia stéviozidu od rebaudiozidu A lepšia.

V experimentálnej časti bola najskôr pre analýzu použitá monolitická kolóna s dĺžkou 100 mm, na ktorej sa však stéviozid a rebaudiozid A od seba neoddělili. Táto kolóna bola preto nahradená inou kolónou s dĺžkou 150 mm, pevným jadrom a veľkosťou častíc 2,7 μm . Po úprave podmienok pre HPLC analýzu sa podarilo vyvinúť metódu separácie stéviozidu a rebaudiozidu A, pričom mobilná fáza bola tvorená acetonitrilom a acetátovým pufrom s pH 4,2. Pomer zložiek mobilnej fázy bol 29:71 v/v. Rýchlosť toku mobilnej fázy bola 0,28 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota kolóny bola nastavená na 50 °C. Doba separácie spomínaných steviol-glykozidov nepresiahla 19 minút, pričom retenčný čas rebaudiozidu A bol približne 16,8 minút a stéviozidu približne 17,6 minút. Vyvinutá metóda umožňuje stanoviť popri týchto látkach i kyselinu benzoovú a sorbovú, ktoré patria medzi konzervačné látky. Retenčný čas kyseliny benzoovej bol 8,5 minút a kyseliny sorbovej bol 10,1 minúty. Všetky stanovované látky sú po analýze dostatočne oddelené. Doteraz nebola publikovaná metóda analýzy vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, ktorou by bolo možné takto jednoducho a pomerne rýchlo stanoviť súčasne stéviozid, rebaudiozid A, kyselinu benzoovú a sorbovú. Vyvinutá metóda v tejto diplomovej práci je preto vhodná aj pre využitie v praxi.

Vhodnosť tejto metódy bola overená analýzou vybraných nealkoholických nápojov. Jednalo sa o 4 nápoje od Pivovaru Černá Hora a 1 nápoj od Kofoly Československo. Obsah analyzovaných látok sa v jednotlivých nápojoch líšil, ale ani v jednom nebolo presiahnuté maximálne množstvo povolené legislatívou.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] CHATSUDTHIPONG, V., MUANPRASAT, CH.: Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2009, roč. 121, č. 1, s. 41-45, [cit. 17. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725808001927>
- [2] MOTARJEMI, Y., MOY, G., TODD, E.: *Encyclopedia of food safety*. 1 vyd. Oxford: Elsevier, 2014, s. 2304. ISBN 978-0-12-378613-5
- [3] WOOD, H. B., a kol.: Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1955, roč. 20, č. 7, s. 875-883 [cit. 8. 10. 2015]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01125a012>
- [4] VALÍČEK, P., VANĚK, T., NEPOVÍM, A.: Diabetes mellitus a rostliny, *Remedia*, 1996, roč. 6, č. 2-3. s. 150-151.
- [5] VALÍČEK, P., KOKOŠKA, L.: *Léčivé rostliny třetího tisíciletí*. 1 vyd. Benešov: START, 2001. ISBN 80-862-3114-3.
- [6] Natusweet Stevia. [Online] 2012, posledná revízia 4. 6. 2012 [cit: 20. 11. 2014] http://www.natusweet.de/_lccms_/_00118/Suessstoff-Stevia-pflanzliches-suessungs.htm?VER=120904173526&MID=121&LANG=ger.
- [7] BRANDLE, J. E., TELMER, P. G.: Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* [online]. 2007, roč. 68, č. 14, s. 1855-1863 [cit. 9. 10. 2014]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942207000933>
- [8] NEPOVÍM, A.: *Studium obsahových látek v intaktních a tumorově transformovaných rostlinách u druhu Stevia rebaudiana Bertoni*. Praha, 1998. 11 s. Dizertačná práca na Katedre tropických a subtropických plodín na České zemědělské univerzitě v Praze.
- [9] NAKAMURA, S., TAMURA, Y.: Variation in the main glycosides of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 1985, roč. 29, č. 2, s. 109-115 [cit. 9. 10. 2014].
- [10] SINGH, S. D., RAO, G. P.: Stevia: The herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech* [online], 2005, roč. 7, č. 1, s. 17-24 [cit. 12. 10. 2014]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBBF02942413>
- [11] ZUBENKO, V.F. a kol.: Storage of the rhizomes of Stevia propagated by green cuttings. *Soviet agricultural sciences*. 1991, roč. 6, č. 1, s. 20-21 [cit. 2. 11. 2015].
- [12] SERIO, L.: La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre. *Phytothérapie* [online], 2010, roč. 8, č. 1, s. 26-32 [cit. 2. 11. 2014]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10298-010-0526-4>
- [13] Stévia-sladký liek z prírody. *Metabolizmus.sk*. [online]. 3. 2. 2013 [cit. 2. 11. 2014]. Dostupné z: <http://metabolizmus.sk/zdrave-potraviny/stevia-sladky-liek-z-prirody/>

- [14] Best of 2011 Services Provider: International Stevia Council. *Nutritional OUTLOOK* [online]. 14. 12. 2011 [cit. 2. 11. 2014]. Dostupné z: <http://www.nutritionaloutlook.com/article/best-2011-ingredient-supplier-international-stevia-council-4-8430>
- [15] BERNAL, J. a kol.: Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online], 2011, roč. 55, č. 4, s. 758-774 [cit. 24. 6. 2014]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170851000676X>
- [16] KINGHORN, A. D.: *Stevia: The Genus Stevia*. 1 vyd. Londýn: Taylor & Francis, 2002. s. 224. ISBN 0-415-26830-3
- [17] KOVYLAEVA, G. I. a kol.: Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* [online], 2007, roč. 43, č. 1, s. 81-85 [cit. 24. 6. 2014]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10600-007-0037-x>
- [18] GEUNS, J. M. C.: Stevioside. *Phytochemistry* [online], 2003, roč. 64, č. 5, s. 913-921 [cit. 26. 6. 2014]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942203004266>
- [19] Zloženie a porovnanie sladivosti. *Stevia, sladidlo 3. tisícročia* [online]. 1. 3. 2013, [cit. 26. 6. 2014]. Dostupné z: <http://www.stevia.eu.sk/sladivost-steviozid-rebaudiozid>
- [20] BONDAREV, N. I. a kol.: Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum* [online], 2003, roč. 47, č. 2, s. 261-264 [cit. 12. 1. 2015]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1023/B%3ABIO.0000022261.35259.4f>
- [21] KROYER, G.: Stevioside and *Stevia*-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* [online], 2010, roč. 5, č. 2, s. 225-229 [cit. 12. 1. 2015]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00003-010-0557-3>
- [22] PRAKASH, I. a kol.: Development of rebiana, a natura, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology* [online], roč. 46, č. 7, s. 75-82 [cit. 17. 1. 2015]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554769>
- [23] CARAKOSTAS, M. C. a kol.: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* [online], 2008, roč. 46, č. 7, s. 1-10 [cit. 17. 1. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691508002342>
- [24] STARRATT, A. N. a kol.: Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* [online], 2002, roč. 59, č. 4, s. 367-370 [cit. 17. 1. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942201004162>

- [25] CHATURVEDULA, V. S. P., a kol.: Minor diterpenoid glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Letters* [online], 2011, roč. 4, č. 3, s. 209-212, [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390011000036>
- [26] ABOU-ARAB, A a kol.: Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 2010, roč. 4, s. 269-281, [cit. 10. 3. 2015].
- [27] TADHANI, M., SUBHASH, R.: Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Science*, 2006, roč. 6. s. 321-326, [cit. 10. 3. 2015].
- [28] KIM, I. a kol.: The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT – Food Science and Technology*, roč. 44, s. 1328-1332, [cit. 10. 3. 2015].
- [29] VALÍČEK, P., VANĚK, T., NEPOVÍM, A.: Determination of Stevioside in Plant Material and Fruit Teas. *Journal of food composition and analysis* [online]. 2001, roč. 14, č. 4, s. 383-388 [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157500909748>
- [30] WOLWER-RIECK, U., TOMBERG, W., WAWRZUN, A.: Investigations on the Stability of Stevioside and Rebaudioside A in Soft Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online], 2010, roč. 58, č. 23, s. 12216-12220, [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=S2qzTa4ENsdblvDd8Ze&page=1&doc=1
- [31] LIU, J., LI, J-W, TANG, J.: Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioprocess Technology* [online], 2010, roč. 88, č. 2-3, s. 215-221, [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308510000040>
- [32] YU, C., XU, K., SHI, Y.: The spectrum model established for measuring the contents of Rebaudioside A and Stevioside quickly in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia* [online], 2011, roč. 5, s. 855-861, [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610211010873>
- [33] BERGS, D., a kol.: Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* [online], 2012, roč. 7, č. 2, s. 147-154, [cit. 7. 3. 2015]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00003-012-0760-5>
- [34] TADA, A. a kol.: Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications. *American Journal of Analytical Chemistry* [online], 2013, roč. 4, č. 4, s. 190-196 [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z: http://file.scirp.org/Html/4-2200537_30452.htm

- [35] LORENZO, C. a kol.: Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* [online]. 2014, roč. 157, č. 5, s. 518-523 [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614002738>
- [36] BILILIGN, T. a kol.: Development and Validation of a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for Routine Identification and Purity Assessment of High-Purity Steviol Glycoside Sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online], 2014, roč. 62, č. 6, s. 1384-1389 [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf4047557?journalCode=jafcau>
- [37] GÖREN, A. C. a kol.: HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredits laboratories via proficiency test in Turkey. *Food Chemistry* [online], 2015, roč. 175, s. 273-279 [cit. 5. 3. 2015]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614018238>
- [38] PORUBČANOVÁ, V.: *Obsah vybraných biologicky aktivních látek ve stévii cukerné*. Brno, 2013. 47 s. Bakalárska práca na Fakulte Chemickej na Ústave chemie potravín a biotechnológií. Vedúca bakalárskej práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Glu	glukóza
HILIC	(hydrophilic interaction chromatography) hydrofilná interakčná chromatografia
HPLC	(high performance liquid chromatography) vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
JECFA	(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) Spoločný výbor expertov FAO/WHO pre potravinárske aditíva
NIR	(near infrared spectroscopy) blízka infračervená spektroskopia
NMR	(nuclear magnetic resonance) nukleárna magnetická rezonancia
Ram	ramnóza
reb A	rebaudiozid A
SPE	(solid shase sxtraction) extrakcia na pevnej matrici
Xyl	xylulóza

8 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č. 1: Prehľadná tabuľka literárnej rešerše, podmienky HPLC analýz

Príloha č. 2: Chromatogram zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A (Stevia Silver 250)

Príloha č. 3: Kalibračná krivka rebaudiozidu A

Príloha č. 4: Kalibračná krivka kyseliny benzoovej a sorbovej

Príloha č. 5: Chromatogram vzorky nápoja Grena (Pivovar Černá Hora)

Príloha č. 6: Chromatogram vzorky nápoja Kombajnérka (Pivovar Černá Hora)

Príloha č. 7: Chromatogram vzorky nápoja Malina (Pivovar Černá Hora)

Príloha č. 8: Chromatogram vzorky nápoja Zázvorka (Pivovar Černá Hora)

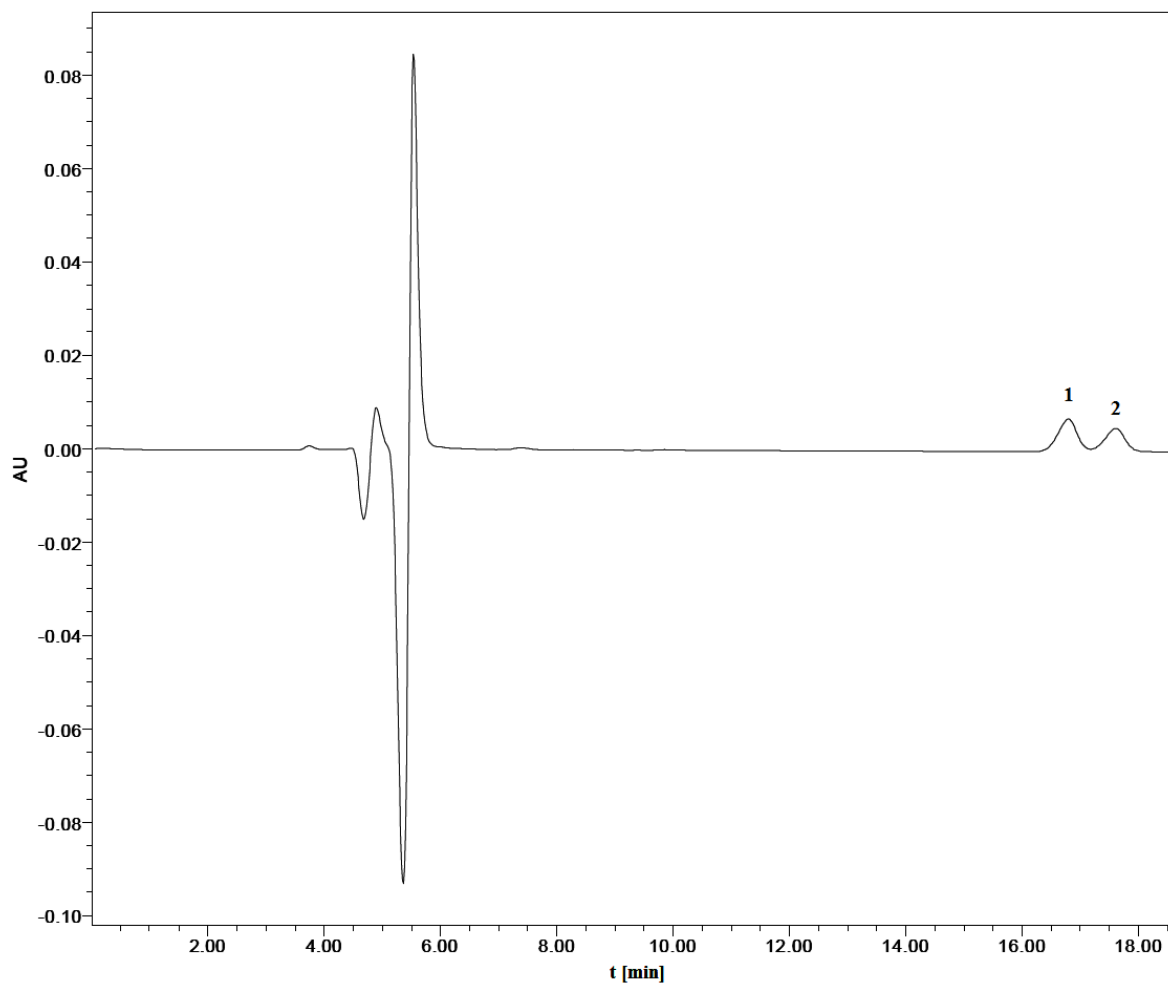
Príloha č. 9: Chromatogram vzorky nápoja Jupík Multivitamín (Kofola ČeskoSlovensko)

9 PRÍLOHY

Príloha č.1: Prehľadná tabuľka literárnej rešerše, podmienky HPLC analýz

Kolóna	Mobilná fáza	Elúcia	Prietok [ml·min ⁻¹]	Teplota [°C]	Odkaz
SiC18, RP (250x4 mm; 7 µm)	acetonitril, voda	gradient	1	25	[29]
Luna HILIC (250 x 4,6 mm)	acetonitril, voda	izokratická (80:20 v/v)	1	36	[30]
Zorbax Eclipse XDB-C18	acetonitril, voda	izokratická (70:30 v/v)	1	25	[31]
Luna NH ₂ (250 x 4,6 mm; 5µm)	acetonitril, voda	izokratická (78:22 v/v)	1	-	[32]
Purospher Star RP-18 (250 x 4,6 mm; 5µm)	acetonitril, voda (pH 2,75)	izokratická (35:65 v/v)	1	50	[33]
Capcell Pak C18 MGII Shim-pack CLC-ODS Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)	acetonitril, pufor (10 mmol·l ⁻¹ Na ₃ PO ₄ , pH 2,6)	izokratická (32:68 v/v)	1	40	[34]
Develosil ODS-HG (250 x 4,6 mm; 5µm) Luna HILIC (150 x 4,6 mm; 5µm)	acetonitril, voda	izokratická, gradient	1	30	[35]
Capcell Pak C18 MGII (250 x 4,6 mm; 5µm) YMC ODS-AQ (250 x 4,6 mm; 5µm) Sherzo SM-C18 (250 x 4,6 mm; 3µm)	acetonitril, pufor (5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3)	gradient	0,5	32	[36]

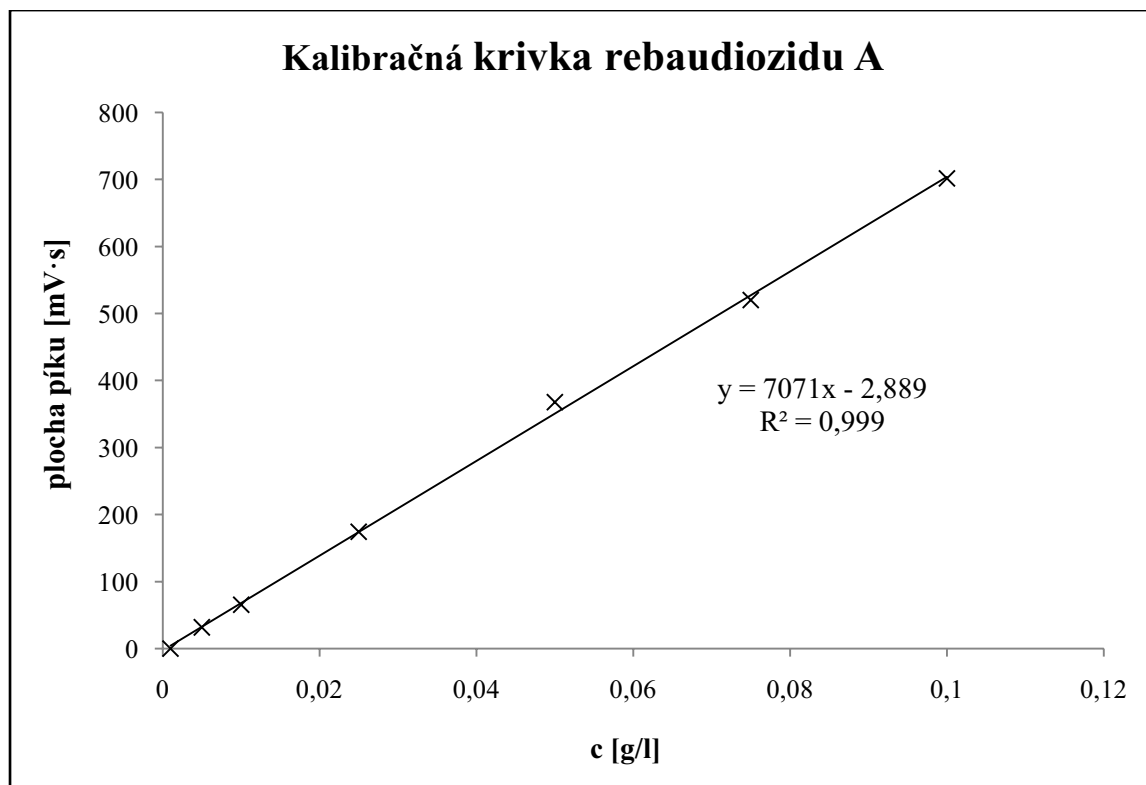
Príloha č. 2: Chromatogram zmesi stéviozidu a rebaudiozidu A (Stevia Silver 250)



Obrázok 25: Chromatogram látky Stevia Silver 250. Píky: 1. rebaudiozid A, 2. stéviozid

Tabuľka 10: Hodnoty plôch pík v závislosti na koncentrácii štandardu rebaudiozidu A

Koncentrácia [g/l]	Plocha píku [mV·s]
0,005	31,752
0,010	65,280
0,025	174,456
0,05	367,757
0,075	579,971
0,100	701,460

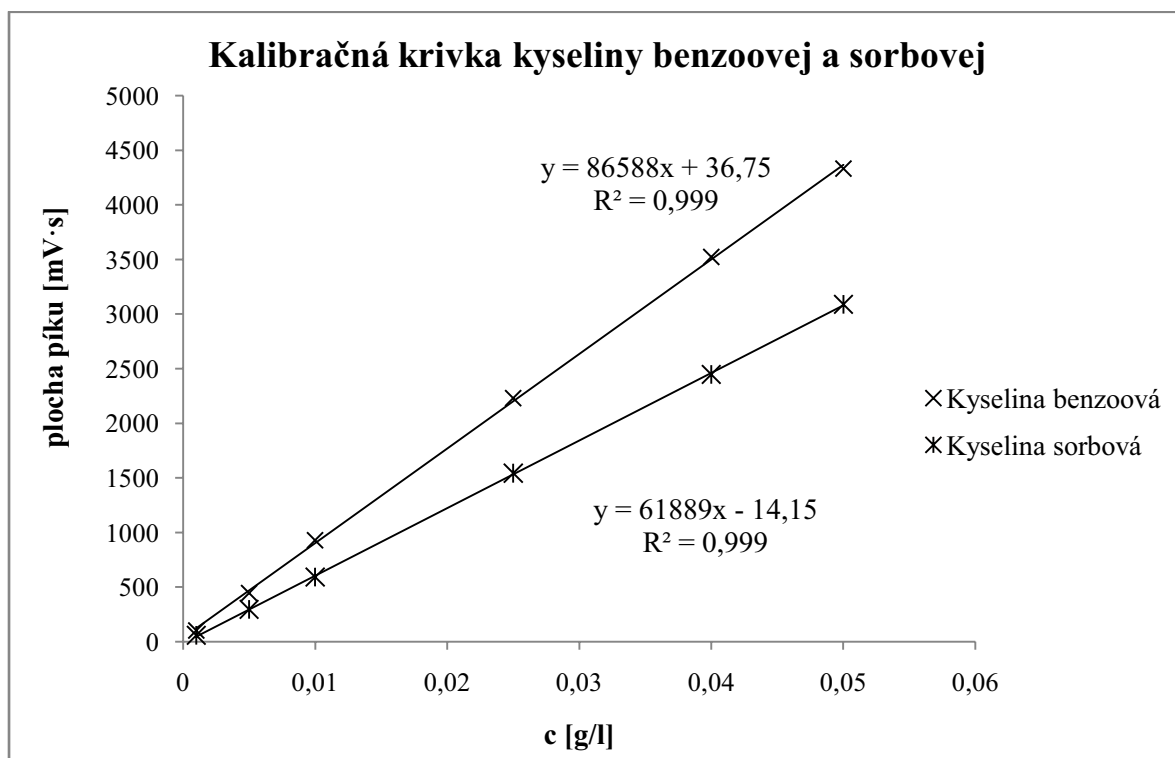


Graf 6: Graf závislosti plochy píku na koncentrácii rebaudiozidu A

Príloha č. 4: Kalibračná krivka kyseliny benzoovej a sorbovej

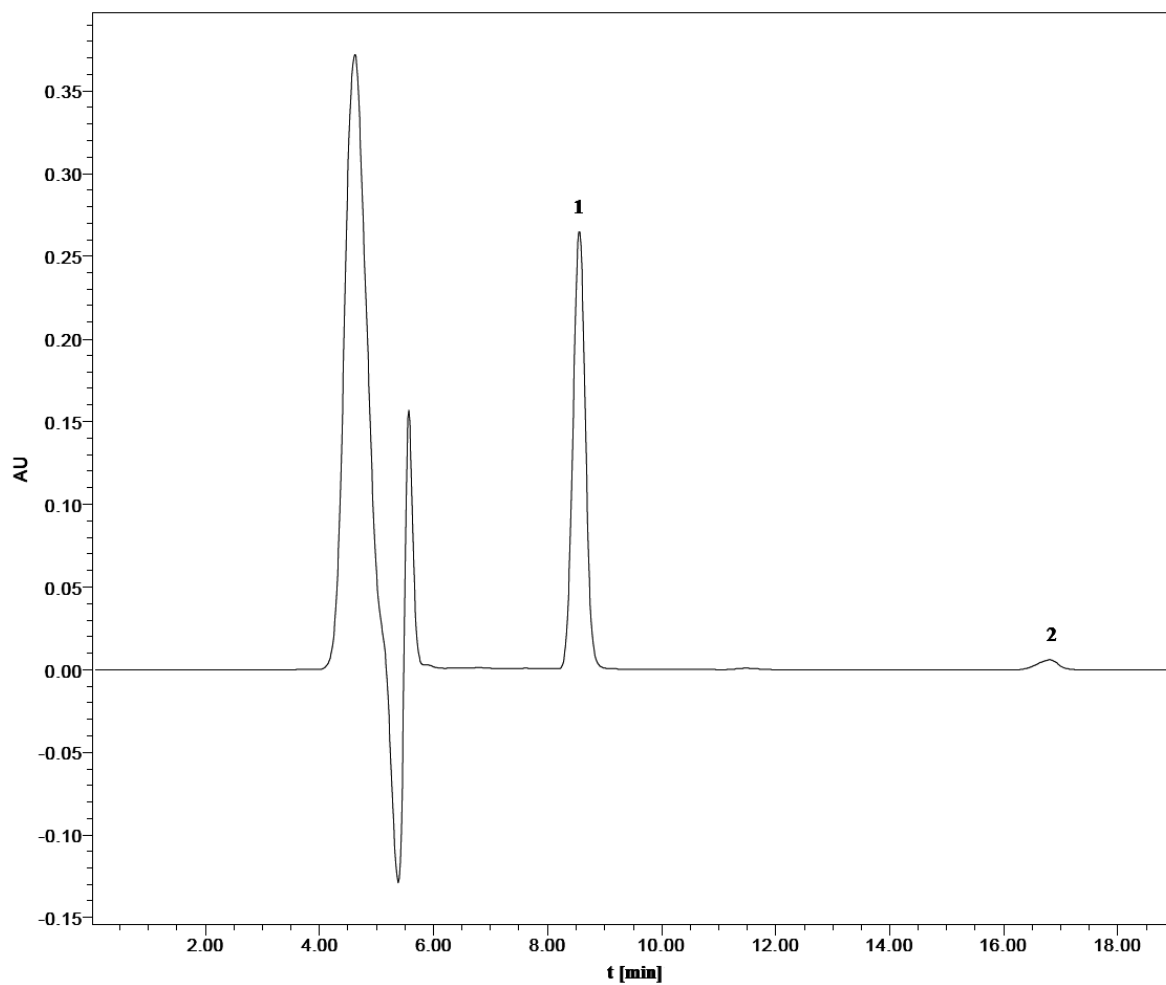
Tabuľka 11: Hodnoty plôch pík v závislosti na koncentrácii kyseliny benzoovej a sorbovej

Koncentrácia [g/l]	Plocha píku [mV·s]	
	Kyselina benzoová	Kyselina sorbová
0,001	103,43	57,968
0,005	446,236	294,149
0,010	929,449	591,015
0,025	2231,266	1542,427
0,040	3521,592	2447,980
0,050	4331,585	3089,047



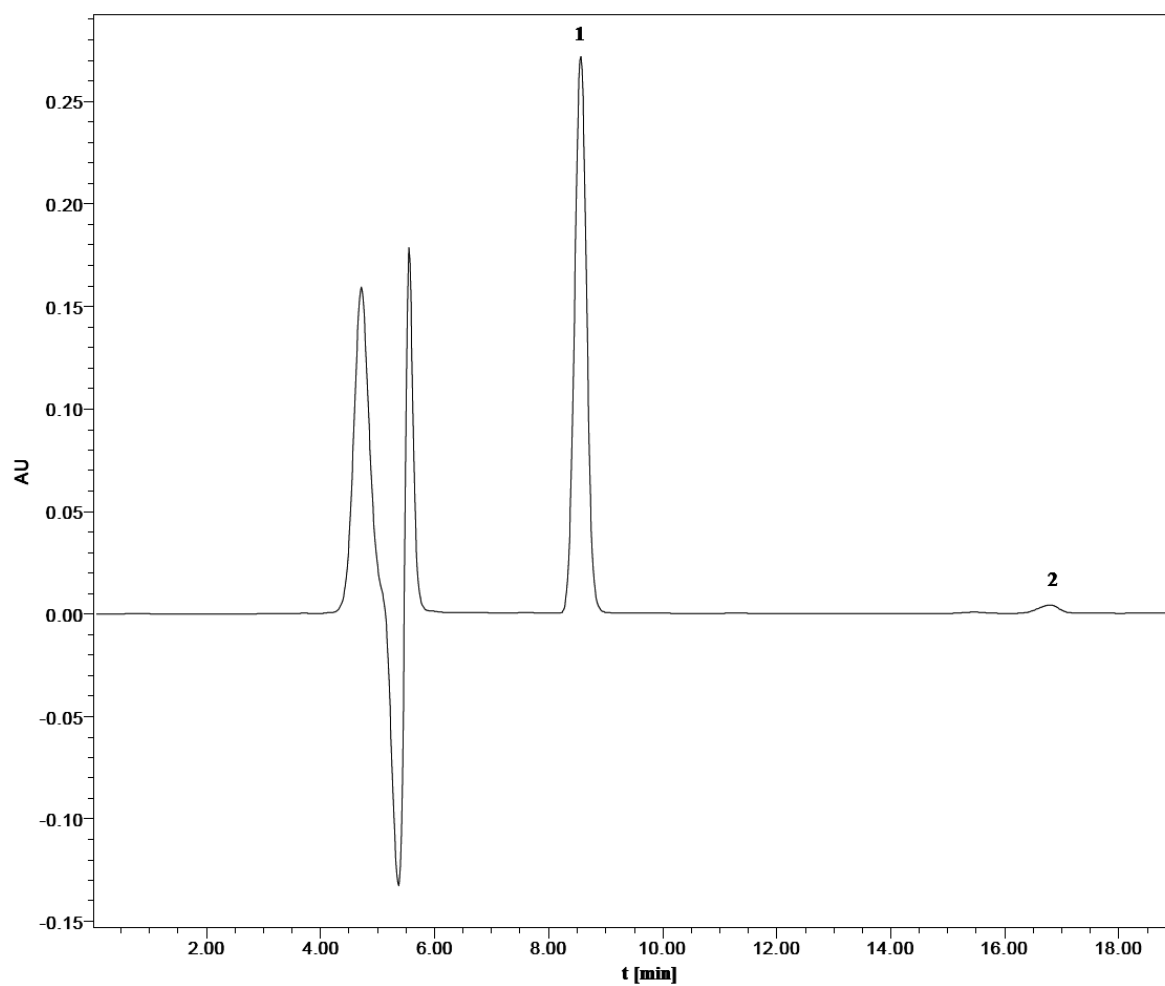
Graf 7: Graf závislosti plochy píku na koncentrácii kyseliny benzoovej a sorbovej

Príloha č. 5: Chromatogram vzorky nápoja Grena (Pivovar Černá Hora)



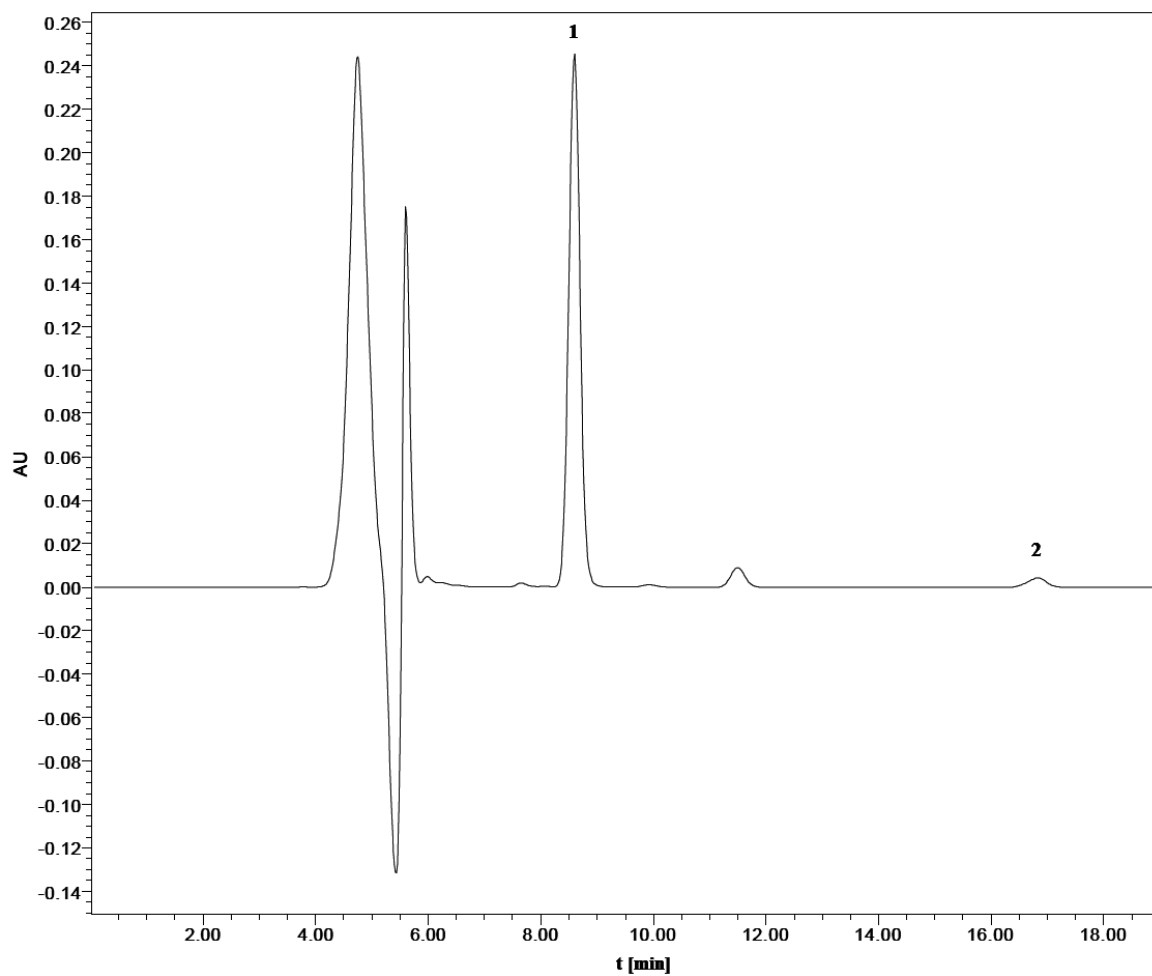
Obrázok 26: Chromatogram nápoja Grena. Píky: 1. kyselina benzoová, 2. rebaudiozid A

Príloha č. 6: Chromatogram vzorky nápoja Kombajnérka (Pivovar Černá Hora)



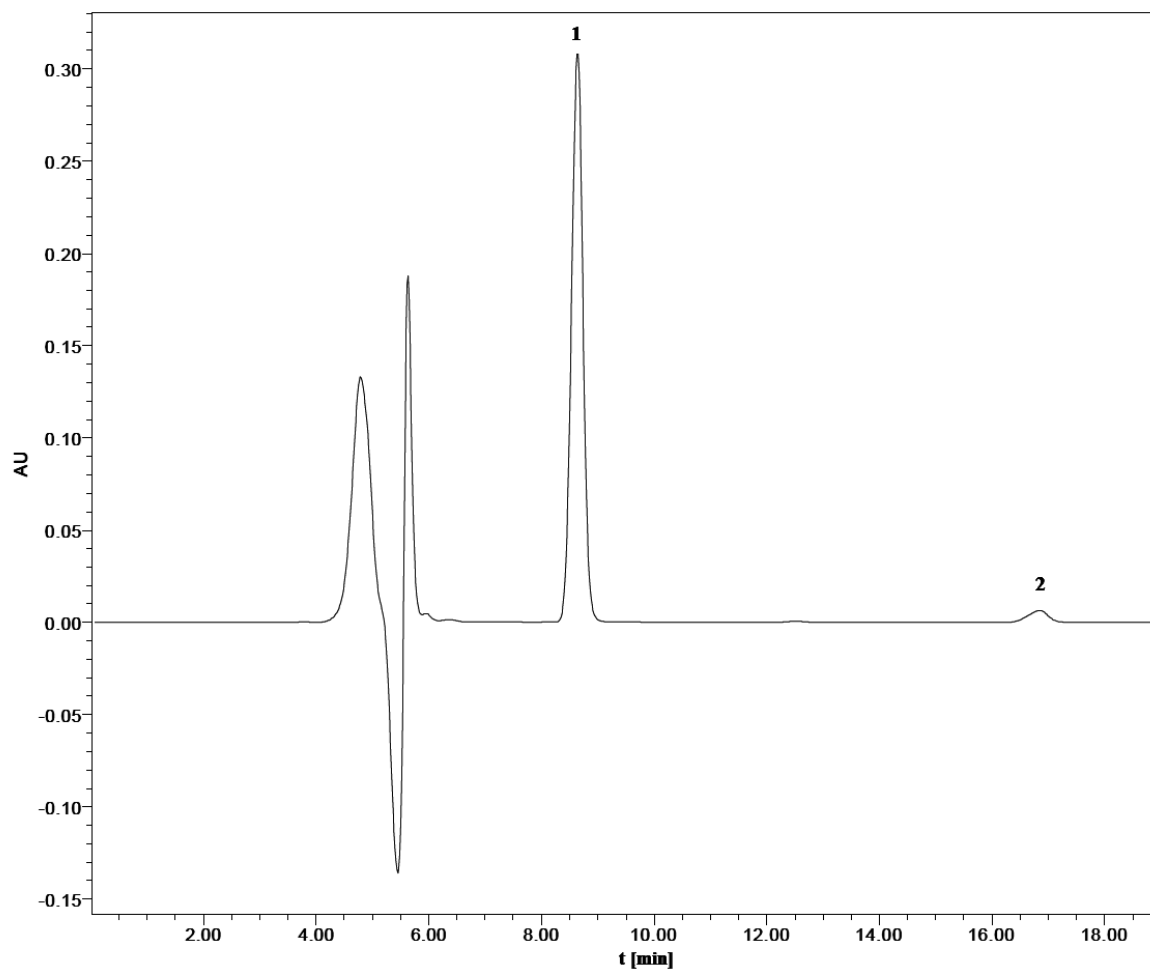
Obrázok 27: Chromatogram nápoja Kombajnérka. Píky: 1. kyselina benzoová, 2. rebaudiozid A

Príloha č. 7: Chromatogram vzorky nápoja Malina (Pivovar Černá Hora)



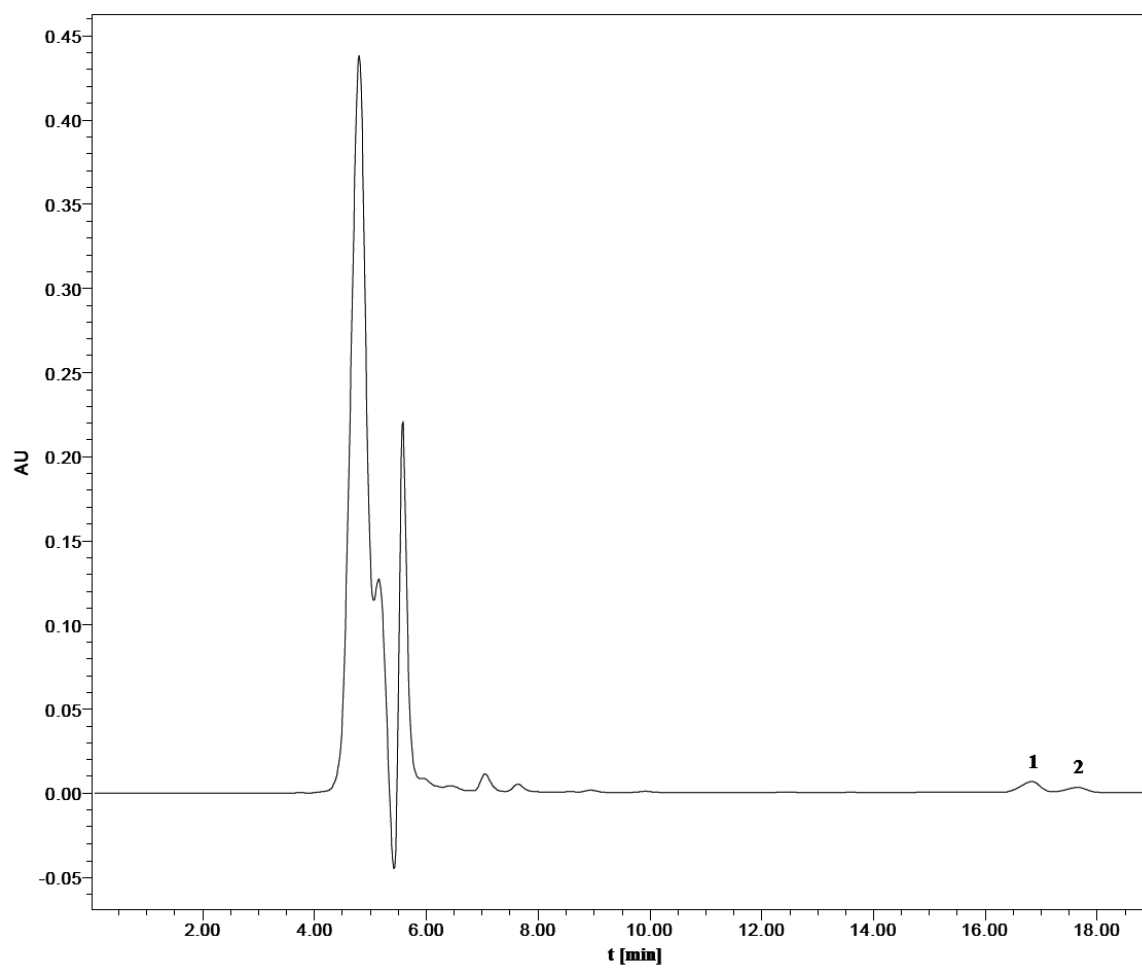
Obrázok 28: Chromatogram nápoja Malina. Píky: 1. kyselina benzoová, 2. rebaudiozid A

Príloha č. 8: Chromatogram vzorky nápoja Zázvorka (Pivovar Černá Hora)



Obrázok 29: Chromatogram nápoja Zázvorka. Píky: 1. kyselina benzoová, 2. rebaudiozid A

Príloha č. 9: Chromatogram vzorky nápoja Jupík Multivitamín (Kofola ČeskoSlovensko)



Obrázok 30: Chromatogram nápoja Jupík Multivitamín. Píky: 1. rebaudiozid A, 2. stéviozid