

Stanovení vybraných sladidel v nápojích Ramanovou spektroskopií

Bc. Lucie Kunčarová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Lucie Kunčarová
Osobní číslo:	T23274
Studijní program:	N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Stanovení vybraných sladidel v nápojích Ramanovou spektroskopií

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část
Charakteristika vybraných nízkokalorických sladidel
Metody používané pro stanovení sladidel
Použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení sladidel
II. Praktická část
Naměření Ramanových spekter vybraných nízkokalorických sladidel
Detekce těchto sladidel v nápojích

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] VARGAS JENTZSCH, Paul; TORRICO-VALLEJOS, Sonia; MENDIETA-BRITO, Sonia; RAMOS, Luis A. a CIOBOTĂ, Valerian. Detection of counterfeit stevia products using a handheld Raman spectrometer. Online. Vibrational Spectroscopy. 2016, roč. 83, s. 126-131. ISSN 09242031.
- [2] BUYUKGOZ, Guluzar Gorkem; BOZKURT, Akif Goktug; AKGUL, Nese Basaran; TAMER, Ugur a BOYACI, Ismail Hakkı. Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy. Online. European Food Research and Technology. 2015, roč. 240, č. 3, s. 567-575. ISSN 1438-2377.
- [3] NICOLUCCI, Icaro Gouvea; DA SILVA, Beatriz Scardua; BRAGA, Patricia Aparecida de Campos a BRAGOTTO, Adriana Pavesi Ariseto. Simultaneous determination of nine high-intensity sweeteners in liquid and powder tabletop sweeteners. Online. Food Additives & Contaminants: Part A. 2023, roč. 40, č. 10, s. 1298-1306. ISSN 1944-0049.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce: **1. ledna 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 14. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Tato práce je věnována stanovení sladidel pomocí Ramanovy spektroskopie. Cílem diplomové práce bylo v teoretické části charakterizovat vybraná sladidla a jejich stanovení Ramanovou spektroskopií včetně popisu hlavních spektrálních píků, které jsou typické pro jednotlivá sladidla. V praktické části bylo cílem využít Ramanovy spektroskopie pro detekci vybraných sladidel v krystalické formě samostatně a ve směsi a detekce těchto látek v komerčně dostupných nápojích. Výsledky ukázaly, že Ramanova spektroskopie je účinnou metodou pro identifikaci a kvantifikaci sladidel.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, acesulfam K, aspartam, cyklamát, erytritol, sacharin, sukralóza, xylitol, inulin

ABSTRACT

This thesis is focused on the determination of sweeteners using Raman spectroscopy. The aim of the thesis was to characterize selected sweeteners in the theoretical part and their determination by Raman spectroscopy, including the description of the main spectral peaks that are characteristic for each sweetener. The practical part aimed to apply Raman spectroscopy for the detection of selected sweeteners in their crystalline form, both individually and in mixtures, as well as detecting these substances in commercially available beverages. The results demonstrated that Raman spectroscopy is an effective method for the identification and quantification of sweeteners.

Keywords: Raman spectroscopy, acesulfame K, aspartame, cyclamate, erythritol, saccharin, sucralose, xylitol, inulin

Mé velké poděkování patří paní Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za skvělé vedení a pomoc na této diplomové práci.

Další velké poděkování patří paní Ing. Michaelle Mikuličové, Ph.D. za ochotu a pomoc při měření na Ramanově spektrometru.

„Vše je jed, a nic není bez jedu; pouze dávka rozhoduje, zda něco je nebo není jed“
(Paracelsus, 16. století).

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH NÍZKOKALORICKÝCH SLADIDEL.....	13
1.1 ACESULFAM K – E950	13
1.1.1 Vlastnosti acesulfamu K	14
1.2 ASPARTAM – E951	15
1.2.1 Vlastnosti aspartamu	15
1.3 CYKLAMÁT – E952	17
1.3.1 Vlastnosti cyklamátu	17
1.4 ERYTRITOL – E968.....	18
1.4.1 Vlastnosti erytritolu.....	18
1.5 SACHARIN – E954	20
1.5.1 Vlastnosti sacharinu	20
1.6 SUKRALÓZA – E955	21
1.6.1 Vlastnosti sukralózy	21
1.7 XYLITOL – E967.....	22
1.7.1 Vlastnosti xylitolu	22
1.8 INULIN.....	23
2 STANOVENÍ OBSAHU SLADIDEL V POTRAVINÁCH.....	24
2.1 METODY POUŽÍVANÉ PRO STANOVENÍ SLADIDEL.....	24
2.2 ČESKÉ TECHNICKÉ NORMY PRO STANOVENÍ SLADIDEL	25
3 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	26
4 STANOVENÍ SLADIDEL POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE	28
4.1 ACESULFAM K	28
4.2 ASPARTAM	28
4.3 CYKLAMÁT	29
4.4 ERYTRITOL.....	29
4.5 SACHARIN	30
4.6 SUKRALÓZA	30
4.7 XYLITOL.....	30
4.8 INULIN.....	31
4.9 D-FRUKTÓZA.....	31
4.10 D-GLUKÓZA	31

4.11	SACHARÓZA	32
II	PRAKTICKÁ ČÁST	33
5	CÍL PRÁCE	34
6	MATERIÁL A METODY	35
6.1	SLADIDLA VE FORMĚ PRÁŠKŮ	35
6.2	NÁPOJE S OBSAHEM SLADIDEL	36
6.3	CHEMIKÁLIE	37
6.4	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	38
6.4.1	Ramanův spektrometr.....	38
6.4.2	Software pro zobrazení naměřených dat	39
6.5	MĚŘENÍ SPEKTER PRÁŠKOVÝCH VZORKŮ SLADIDEL	40
6.6	MĚŘENÍ SPEKTER SMĚSÍ SLADIDEL	40
6.7	MĚŘENÍ SPEKTER SLADIDEL V ROZTOKU	41
6.8	MĚŘENÍ SPEKTER SLADIDEL Z ODPAŘENÝCH ROZTOKŮ	41
6.9	MĚŘENÍ SLADIDEL V NÁPOJÍCH.....	41
6.10	MĚŘENÍ SLADIDEL V NÁPOJÍCH PO ODPAŘENÍ	42
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
7.1	RAMANOVA SPEKTRA SLADIDEL	43
7.2	RAMANOVA SPEKTRA SYPKÝCH SMĚSÍ SLADIDEL	51
7.3	RAMANOVA SPEKTRA SMĚSÍ SLADIDEL SE ZVYŠUJÍCÍ SE KONCENTRACÍ	55
7.4	RAMANOVA SPEKTRA SLADIDEL V ROZTOKU.....	58
7.5	RAMANOVA SPEKTRA ODPAŘENÝCH ROZTOKŮ SLADIDEL O RŮZNÉ KONCENTRACI	59
7.6	RAMANOVA SPEKTRA SLADIDEL V NÁPOJÍCH	61
8	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
	SEZNAM PŘÍLOH.....	78

ÚVOD

Značný počet potravin a nápojů je pro snížení kalorické hodnoty slazeno směsí různých nízkokalorických sladidel. Takové potraviny těží ze vzájemné synergie správně volených sladidel a získávají tak lepší chuťové vlastnosti oproti potravinám, které obsahují jedno sladidlo. Různá kombinace sladidel napomáhá docílit chuti co nejvíce podobné cukru a zamaskovat případné pachutě. Vývoj v oblasti nápojů v posledních letech zahrnuje nahrazení cukru v nápojích nízkokalorickými sladidly, jako je acesulfam K, aspartam a jiné.

I přesto, že náhradní sladidla mohou být vhodnou volbou pro snížení energetické hodnoty potravin, nebo alternativou pro osoby trpící diabetem, tak jsou stále veřejností vnímána kontroverzně a jsou i nadále předmětem řady odborných studií. Důvodem jsou přetrvávající obavy z možných negativních dopadů na lidské zdraví jako je rakovina, ovlivňování střevní mikrobioty, vliv na vyplavení inzulinu a na krevní glykémii, nebo na tvorbu zubního kazu.

Používání sladidel v potravinářství podléhá legislativním předpisům, které se liší v závislosti na konkrétní zemi nebo regionu. Některá sladidla jsou v určitých částech světa povolena, zatímco jinde mohou být zakázána. Jejich maximální přístupné množství je stanoveno příslušnými normami.

Stanovování sladidel je důležité pro ochranu zdraví spotřebitelů, kontrolu dodržení legislativních limitů, správné označování a informovanost o produktech. Pro zjištění případného nadlimitního množství sladidel ve výrobcích, pro dohledávání použití nepovolených sladidel, nebo pro ověření, zda se ve sladidlech nevyskytují příměsi jiných často levnějších sladidel, je nutné mít k dispozici spolehlivé a rychlé analytické metody.

Stanovení sladidel se nejčastěji provádí pomocí velmi přesných a relativně náročných laboratorních metod (například kapalinová chromatografie), které obvykle vyžadují pečlivou přípravu vzorku před samotným měřením mnohdy za použití rozpouštědel a chemických činidel. Ramanova spektroskopie je jednoduchá a rychlá metoda většinou bez nutnosti přípravy vzorku. Stanovení lze provádět v laboratořích nebo i přímo v terénu pomocí přenosného spektrometru, což může být výhodné pro dozorové orgány. Cílem diplomové práce je využít této spektroskopické metody pro stanovení vybraných sladidel samostatně, ve směsi a v nápojích.

I TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH NÍZKOKALORICKÝCH SLADIDEL

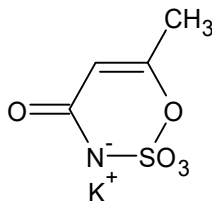
Vysoce intenzivní sladidla jsou přírodní, nebo syntetické, nízkokalorické nebo nekalorické chemické látky, které jsou mnohonásobně sladší než sacharóza. K dosažení stejné úrovně sladkosti jako cukr nebo vyšší stačí jen malé množství těchto sladidel. Běžně se používají jako alternativa cukru v potravinách a nápojích a k přípravě tabletových sladidel. Mezi nejčastěji používaná sladidla patří acesulfam K, aspartam, cyklamát, erytritol, sacharin, sukralóza, xylitol a inulin (Nicoluci et al., 2023).

Sladidla se mnohdy používají ve směsích pro zvýšení jejich sladivých účinků a optimalizaci výsledné chuti. Například sladivosti odpovídající přibližně 10 % sacharózy dodávají koncentrace v rozmezí 500 až 600 mg/l acesulfamu K nebo aspartamu, zatímco stejné sladivosti lze dosáhnout použitím směsi pouze 160 až 180 mg/l každého ze sladidel. Poměry směsí acesulfamu K a aspartamu se mohou lišit zejména v nápojích s různými příchutěmi (O'Brien-Nabors, 2016).

Pro zachování stejné intenzity sladké chuti minimálně po dobu trvanlivosti nápoje je zvláště důležitá stabilita sladidel. Zejména je nezbytná stabilita v teplém podnebí při delším skladování a stabilita při nízkém pH. Stablní sladivosti s dobrou chuťovou kvalitou se dosahuje například použitím směsí acesulfamu K a sukralózy (O'Brien-Nabors, 2016).

1.1 Acesulfam K – E950

Acesulfam draselný (obrázek 1) byl náhodně syntetizován v roce 1967 ve společnosti Hoechst AG v Německu. Karl Clauss a Harald Jensen provedli reakci 2-butyne s fluorosulfonylisokyanátem. Jeho sladká chuť byla objevena Claussem náhodou po olíznutí prstu od prášku při čištění oděvu. Sladivost acesulfamu K je 200krát vyšší než u sacharózy. Samotná sacharóza má sladivost 1. Ačkoli existují i další deriváty acesulfamu, které mají ještě vyšší sladivost, tak se nejvíce využívá právě acesulfam draselný pro čistotu sladké chuti, která vytváří optimální chuťový dojem, nemá nepříjemný podtón a sladkost nezůstává příliš dlouho na jazyku. Nevýhodou je snižování intenzity sladké chuti s rostoucí teplotou a při vysokých koncentracích acesulfamu K se může objevit hořká chuť (O'Brien-Nabors, 2016; Roth a Lück, 2016).



Obrázek 1 Vzorec acesulfamu K

(zdroj: O'Brien-Nabors, 2016)

1.1.1 Vlastnosti acesulfamu K

Acesulfam K je bílý krystalický prášek vyskytující se ve dvou polymorfních formách, který vykazuje vysokou rozpustnost ve vodě při teplotě 20 °C a se zvyšující se teplotou jeho rozpustnost roste. Naopak v roztocích alkoholu jeho rozpustnost klesá se zvyšujícím se obsahem alkoholu (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016; Roth a Lück, 2016).

Acesulfam K je velmi stabilní při různých hodnotách pH a teplot. Jeho poločas rozpadu je při 20 °C 11,5 let při pH 5,77 a 6,95 let při pH 3,22. K rozkladu může dojít až při teplotách výrazně vyšších, než je 200 °C. Potraviny obsahující acesulfam K mohou projít procesem pasterace i sterilace. Mezi potenciální produkty acesulfamu K vznikající za extrémních podmínek patří aceton, CO₂, amonné soli, sírany a amidosulfonáty (O'Brien-Nabors, 2016; Roth a Lück, 2016).

Acesulfam K je stabilní také při dlouhodobém skladování ve vodném prostředí. Ve velmi kyselých roztocích jako jsou některé nealkoholické nápoje zůstávají sloučeniny acesulfamu i po několika měsících beze změny a bez narušení čistoty chuti (O'Brien-Nabors, 2016; Roth a Lück, 2016).

V Evropské unii se acesulfam K označuje E kódem E950. Vykazuje dobré synergické účinky s aspartamem, čehož se využívá při výrobě nízkokalorických potravinářských výrobků. Jeho maximální denní limit ADI (Acceptable Daily Intake) je 15 mg na kg tělesné hmotnosti na den. Díky jeho vlastnostem je ideálním sladidlem pro výrobu sycených nebo nesycených nealkoholických nápojů, ovocných nektarů, ledových čajů, bylinných nálevů, nápojů v prášku, instantních káv a čajů. Jeho další využití může být například v ochuceném mléce, kakau, jogurtech, dezertech, zmrzlinách, dortech, sušenkách, džemech, žvýkačkách, nakládané zelenině, zubních pastách a ústních vodách (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016; Roth a Lück, 2016).

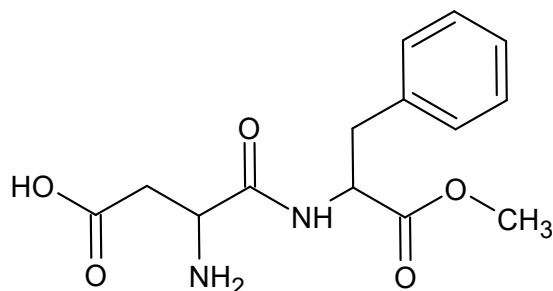
1.2 Aspartam – E951

James Schlatter náhodně objevil aspartam v roce 1965 ve farmaceutické společnosti G.D. Searle v rámci výzkumu léků na léčbu žaludečních vředů (Chattopadhyay et al., 2014; O'Brien-Nabors, 2016). Jeho sladivost je 160 až 220krát vyšší než sladivost sacharózy. Chuť aspartamu je čistá bez přítomných pachutí a jeho chuťový profil je velmi podobný cukru. Má schopnost zvýrazňovat chuť potravin a nápojů zejména s kyselou ovocnou příchutí. Například u žvýkaček dokáže prodloužit dobu sladké chuti až čtyřnásobně (O'Brien-Nabors, 2016).

1.2.1 Vlastnosti aspartamu

Aspartam je bílý krystalický prášek méně rozpustný ve vodě, hůře rozpustný v alkoholu a nerozpustný v olejích. Jeho rozpustnost se s rostoucí teplotou zvyšuje (Chattopadhyay et al., 2014; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016). Aspartam je stabilní při skladování za sucha při teplotách 30 až 80 °C. Ve vodném prostředí je relativně stabilní, při pH 4,3 vykazuje poločas rozpadu 300 dní. Těchto vlastností se v potravinářství využívá při výrobě limonád. Naopak při vysoké teplotě nebo v zásaditém pH dochází k jeho rozkladu (O'Brien-Nabors, 2016).

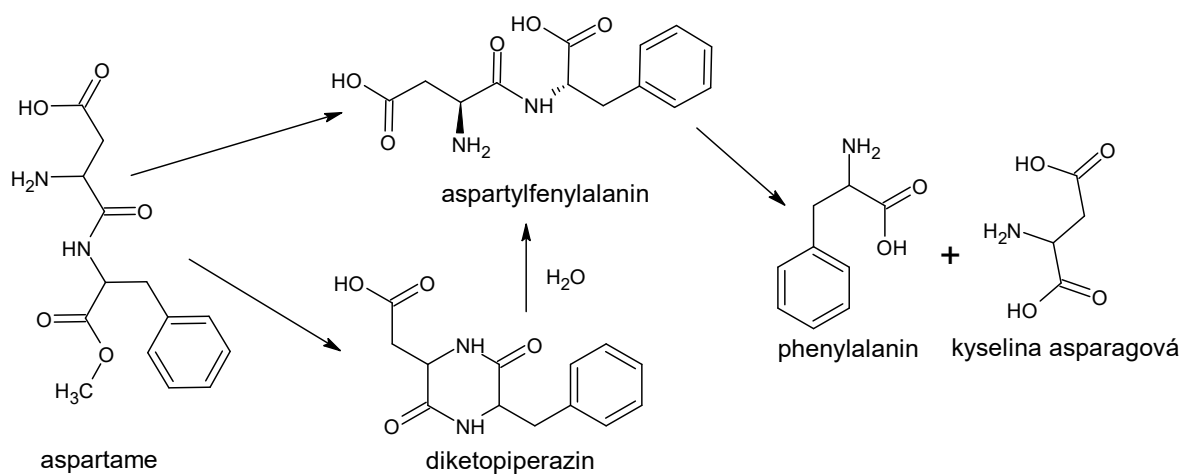
Aspartam (obrázek 2) se skládá z aminokyselin L-asparagové a metylesteru L-fenylalaninu (Chattopadhyay et al., 2014; O'Brien-Nabors, 2016). Dnes patří mezi nejvíce zastoupená sladidla, i přesto že není vhodný pro osoby trpící fenylketonurií, protože u aspartamu dochází k hydrolýze esterové vazby za vzniku aspartylfenylalaninu a metanolu, kdy aspartylfenylalanin může být dále hydrolyzován na aspartát a fenylalanin (obrázek 3). Rozklad aspartamu se odvíjí od vlhkosti prostředí, teploty, pH a doby skladování. Krystalická forma aspartamu je ve vlhkém prostředí méně stabilní. Dále degraduje při vysokých teplotách působících delší dobu, krátkodobému vystavení vysokým teplotám nebo dokonce ultra vysokým teplotám dokáže odolávat (O'Brien-Nabors, 2016). V neutrálním a alkalickém prostředí může podléhat intramolekulární kondenzaci za vzniku diketopiperazinu. Dále může v kyselém prostředí pod pH 4,5 peptidová vazba podléhat hydrolýze za vzniku metylesteru fenyl-alaninu a kyseliny asparagové (Czarnecka et al., 2021; Hutchinson et al., 1999). V důsledku rozkladu aspartamu se snižuje jeho sladká chuť, aniž by docházelo ke vzniku vedlejších pachutí. Ztrácení sladké chuti se u aspartamu projevuje také při reakcích s aldehydy nebo ketony (Czarnecka et al., 2021; Chattopadhyay et al., 2014; O'Brien-Nabors, 2016).



Obrázek 2 Vzorec aspartamu

(zdroj: O'Brien-Nabors, 2016)

Aspartam má označení E951 a jeho maximální ADI podle FDA je 50 mg na kg tělesné hmotnosti na den. Pro svou stabilitu v práškové formě je vhodný hlavně jako stolní sladidlo nebo pro výrobu nápojů v prášku. Další využití má při výrobě nízkokalorických tvrdých cukrovinek, nápojů, jogurtů, žvýkaček, ale i v medicíně a kosmetice. Aspartam se používá také v kombinaci s dalšími sladidly z důvodu synergického efektu (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).



Obrázek 3 Degradace aspartamu

(zdroj: Hutchinson et al., 1999)

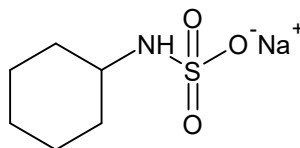
1.3 Cyklamát – E952

Cyklamát byl v roce 1937 syntetizován Michaelem Svedou při jeho postgraduálním studiu na Illinoiské univerzitě v USA. Pro jeho výrobu se využívá sulfonace cyklohexylaminu. V roce 1958 byl oficiálně přijat jako sladidlo úřadem FDA. Cyklamát vykazuje asi 40krát vyšší sladivost než sacharóza. Nástup sladké chuti je oproti cukru pomalejší a má delší dobu výdrže v ústech. Velice dobrou sladivost má v kombinaci s ovocem, kdy se jeho sladivost ještě zvyšuje. Při vyšších koncentracích cyklamátu jeho relativní sladkost klesá, což může být ovlivněno rostoucí hořkostí a pachutí, která je při vysokých koncentracích cyklamátu obvyklá. Sladká chuť se objevuje až po disociaci cyklamátu na ionty, naopak nepříjemná chuť je způsobena jeho nedisociovanou formou. Vápenaté soli cyklamátu jsou méně sladké než soli sodné (Čopíková et al., 2013; Chattopadhyay et al., 2014; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.3.1 Vlastnosti cyklamátu

Krystalická forma solí cyklamátu (obrázek 4) představuje bílý prášek, který je dobře rozpustný ve vodě, ale omezeně rozpustný v olejích a nepolárních rozpouštědlech. Cyklamát v roztoku disociuje na ionty s vlastnostmi silného elektrolytu. Bod tání cyklamátu se pohybuje mezi 169 až 170 °C (O'Brien-Nabors, 2016).

Cyklamát je velmi odolný vůči vyšším teplotám, odolává širokému rozmezí pH a stabilní je i při kontaktu se světlem a vzduchem. Při jeho rozpadu vzniká metabolit cyklohexylamin, který má od cyklamátu odlišné chuťové vlastnosti jako je hořká chuť a zápach. Díky absenci hygroskopických vlastností a odolnosti vůči růstu plísní a bakterií je cyklamát dobře skladovatelný (Chattopadhyay et al., 2014; O'Brien-Nabors, 2016).



Obrázek 4 Vzorec cyklamátu sodného

(zdroj: Chattopadhyay et al., 2014)

Soli cyklamátu nesou označení E952 a jejich ADI je 7 mg na kg tělesné hmotnosti na den. Cyklamát se používá jako ochucovadlo do nápojů, ovocných šťáv, žvýkaček, cukrovinek, salátových dresingů, želé, džemů a polev. Také se používá jako stolní sladidlo ve formě tablet, prášků a tekutin. V uzeninách vytváří lepší chuť a barvu oproti cukru

z důvodu vyššího bodu tání. Cyklamát je kompatibilní s většinou potravin a potravinářských přísad přírodního i syntetického původu, s aromaty, konzervanty a dalšími sladidly. Synergický účinek cyklamátu v kombinaci se sacharinem napomáhá minimalizovat vzniku nepříjemné chuti a zvýšit celkovou sladivost (Čopíková et al., 2013; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.4 Erytritol – E968

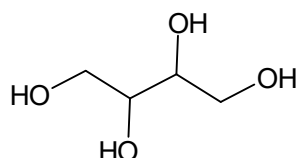
Erytritol byl izolován Lamym v roce 1852 z řasy *Protococcus vulgaris* a o 48 let později byl izolován také z řasy *Trentepohlia jolithus*. Erytritol patří mezi polyhydričné alkoholy zkráceně polyoly. Erytritol se přirozeně vyskytuje v malém množství také v hroznech, hruškách, houbách a ve fermentovaných výrobcích. Mimo extrakci z přírodních zdrojů lze erytritol připravit například fermentací glukózy, sacharózy nebo hydrolýzou škrobu z kukuřice, kdy se řetězce rozkládají na molekuly glukózy a následně se nechají fermentovat na erytritol pomocí osmofilních kvasinek *Moniliella pollinis*. Po fermentaci jsou buňky a nečistoty odstraněny filtrací a erytritol se následně krystalizuje (Boesten et al., 2015; O'Brien-Nabors, 2016).

Polyoly všeobecně nevykazují tak silný sladivý účinek jako intenzivní sladidla. Sladivost erytritolu odpovídá pouze 0,6krát sladivost sacharózy. Nižší sladivost má výhodu v možnosti použití většího recepturního množství při výrobě potravin, a tím zlepšit objem a strukturu výrobku, ale zároveň mají při jejich větší konzumaci projímavé účinky. Profil sladké chuti je u erytritolu podobný sacharóze. Mezi polyoly patří k nejlépe chuťově hodnoceným sladidlům, avšak někteří konzumenti mohou vnímat i sladce kyselou nebo hořkou chuť. Celkovou sladivost erytritolu lze zvýšit jeho smícháním s dalšími sladidly jako je aspartam, sukralóza nebo přírodní sladidlo rebaudiosid A (O'Brien-Nabors, 2016).

1.4.1 Vlastnosti erytritolu

Erytritol (obrázek 5) je bílá nehygroskopická krystalická látka dobře rozpustná ve vodě, slabě rozpustná v etanolu a nerozpustná v diethyletheru. Díky nehygroskopickým vlastnostem je vhodný pro výrobky s minimálním obsahem vlhkosti. Při skladování například ovocných tyčinek, pečiva nebo prášků s obsahem erytritolu nedochází k přílišnému pohlcování vzdušné vlhkosti do výrobku. Dále je vhodný i jako ochranný materiál pro obalení výrobků. Produkty potažené erytritolem jsou stabilnější při relativní vlhkosti vzduchu 85 až 90 % oproti produktům s cukerným potahem. Další vlastností

erytritolu stejně jako ostatních polyolů je chladivý efekt, kdy při rozpouštění krystalů dochází k pohlcování okolní energie. Polyoly mají také antioxidační schopnost, protože dokážou vychytávat hydroxylové radikály (Boesten et al., 2015; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).



Obrázek 5 Vzorec erytritolu

(zdroj: O'Brien-Nabors, 2016)

Erytritol je stabilní ve velkém rozmezí teplot i pH. Po konzumaci je 90 % erytritolu vyloučeno močí v nezměněné podobě. Zbytek projde trávicím traktem přes tlusté střevo, kde nedochází k fermentaci střevními mikroorganismy (Boesten et al., 2015; O'Brien-Nabors, 2016).

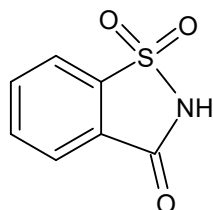
Označení erytritolu je E968. Nejčastěji se používá pro výrobu stolních sladidel, dietních nápojů, žvýkaček, mléčných výrobků, jogurtů, pudingů, zmrzlin a čokolád. Mnohdy se míchá s intenzivními sladidly pro zlepšení sladké chuti výrobku (Boesten et al., 2015; Čopíková et al., 2013; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.5 Sacharin – E954

Sacharin objevili už v roce 1878 Konstantin Fahlberg a Ira Remsen a jeho první výroba byla zavedena v New Yorku v USA. Dnes patří mezi nejrozšířenější sladidla. Pro jeho výrobu se používají dvě metody. Metoda podle Remsenova a Fahlbergova procesu se využívá převážně v Severní Korei a Indii. Metoda podle Maumee se využívá v USA, Číně a také v Indii. Sacharin má 300 až 500krát vyšší sladivost než sacharóza v závislosti na jeho použitém množství. Mimo sladkou chuť vykazuje sacharin také chuť kovovou, která se s vyšší koncentrací zvyšuje. Ke snížení kovové chuti pomáhá přidání malého množství aspartamu (Čopíková et al., 2013; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.5.1 Vlastnosti sacharinu

Sacharin ve formě vápenaté nebo sodné soli, viz obrázek 6, je bílý krystalický prášek. Sodná sůl sacharinu má vyšší rozpustnost ve vodě oproti vápenaté a díky tomu je i více používána. Obě formy mají stejnou intenzitu sladivosti. V suchém stavu i ve vodném roztoku jsou velmi stabilní v širokém rozmezí pH i teplot. V lidském gastrointestinálním traktu nedochází k metabolismu sacharinu. Po konzumaci opouští tělo v nezměněné podobě primárně močí, méně pak stolicí (Čopíková et al., 2013; O'Brien-Nabors, 2016).



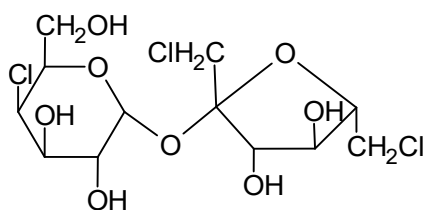
Obrázek 6 Vzorec sacharinu

(Zdroj: Čopíková et al., 2013)

Sacharin má označení E954. Nejčastější použití sacharinu je u nápojů, zubních past, ústních vod, léčiv, kosmetiky, tabáku a také jako stolní sladidlo (Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.6 Sukralóza – E955

Hough a kolegové s podporou společnosti Tate & Lyle PLC v rámci výzkumného programu na Londýnské univerzitě v roce 1976 zjistili, že lze selektivní chlorací sacharózy získat intenzivně sladkou sloučeninu. Sukralóza, viz obrázek 7, vzniká po nahrazení tří hydroxylových skupin chlórem. Takové sladidlo má chuť velmi podobnou cukru bez pachutí, ale jeho celková sladivost je 600krát silnější než u sacharózy. Patří mezi nejslibnější a nejsladší sladidla (Chattopadhyay et al., 2014; O'Brien-Nabors, 2016).



Obrázek 7 Struktura sukralózy

(Zdroj: O'Brien-Nabors, 2016)

1.6.1 Vlastnosti sukralózy

Sukralóza je bílý krystalický prášek, který je dobře rozpustný ve vodě, etanolu a metanolu a nerozpustný v oleji. Jeho glykosidická vazba je mnohem odolnější vůči kyselé a enzymatické hydrolýze, což způsobuje nemožnost jeho metabolismu v trávicím traktu savců ani mikroorganismy v ústech. Díky tomu je sukralóza nekalorická a nekariogenní (O'Brien-Nabors, 2016).

Trvanlivost čisté, suché sukralózy je nejméně dva roky v případě jejího skladování při teplotě do 25 °C. Dlouhodobé skladování při vysokých teplotách může mít za následek změnu barvy. Dále může být trvanlivost ovlivněna použitými obalovými materiály (O'Brien-Nabors, 2016).

V hotových výrobcích je sukralóza relativně stabilní a s časem skladování u ní nedochází ke ztrátě sladivosti. K hydrolýze může dojít jen velmi málo v některých nápojích v závislosti na pH, času a teplotě. Sukralóza má označení E955 s maximálním ADI 15 mg na kg tělesné hmotnosti na den. Vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a přirozené stabilitě může být sukralóza prodávána v suché nebo kapalně formě. Sukralóza se celosvětově hojně používá v různých nápojích například sycených i nesycených, sušených instantních nápojích nebo pro ochucení mléka. Nápoje slazené sukralózou si díky její pozoruhodné stabilitě zachovávají konzistentní sladkost po celou

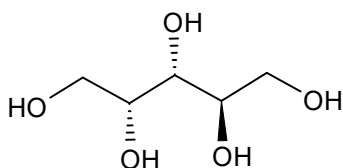
dobu zpracování a skladování výrobku (Čopíková et al., 2013; Chattopadhyay et al., 2014; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Brien-Nabors, 2016).

1.7 Xylitol – E967

Xylitol se řadí mezi polyoly stejně jako erytritol. Jeho přirozený výskyt v malém množství lze nalézt v ovoci a zelenině. V lidském těle se xylitol běžně tvoří při metabolismu glukózy v játrech. Syntetizován byl roku 1891 Emilem Fischerem. Xylitol je nejsladším sladidlem mezi polyoly a s dalšími polyoly vykazuje výrazný synergický efekt. Jeho sladkost je ekvivalentní sacharóze. Vyrábí se přeměnou xylanu například z březového dřeva, jiného tvrdého dřeva, mandlových skořápek, slámy, kukuřičných klasů nebo vedlejších produktů z papírenského a celulózového průmyslu (O'Brien-Nabors, 2016; O'Donnell a Kearsley, 2012).

1.7.1 Vlastnosti xylitolu

Xylitol, viz obrázek 8, je bílý krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě a málo rozpustný v alkoholu. Jeho rozpustnost se zvyšuje se zvyšující se teplotou roztoku. Xylitol je méně hygroskopický než sorbitol a více než sacharóza. Neúčastní se Maillardových reakcí a karamelizace, pouze při teplotách v oblasti bodu varu 216 °C po dobu několika minut může dojít ke tvorbě tmavší barvy. Mnohdy se přidává malé množství redukcujícího cukru nebo barviva pro docílení požadovaného efektu karamelizace (O'Brien-Nabors, 2016; O'Donnell a Kearsley, 2012).



Obrázek 8 Vzorec xylitolu

(zdroj: Chattopadhyay et al., 2014)

Xylitol je stabilní při teplotách až do 120 °C. Při jeho rozpouštění, stejně jako u erytritolu, vytváří chladivý účinek a může tak doplňovat a posilovat mátovou chuť výrobků. Jeho označení je E967. Má význam v prevenci proti zubnímu kazu, kdy se často používá pro výrobu nekariogenních cukrovinek nebo produktů ústní hygieny. Méně často se používá do kosmetických a farmaceutických přípravků. Dále se používá při výrobě nápojů, pečiva, žvýkaček, dezertů, čokolád, mléčných výrobků, cukrovinek a také jako stolní

sladidlo (Čopíková et al., 2013; Chattopadhyay et al., 2014; Nařízení Komise (EU) č. 231/2012; O'Donnell a Kearsley, 2012; Peterson, 2013).

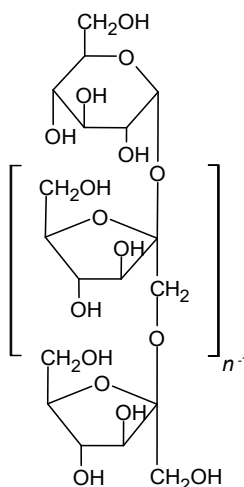
1.8 Inulin

Inulin patří mezi polymery obsahující fruktózu. Byl objeven německým vědcem Rosem v roce 1804 při extrakci vroucí vodou z kořenů *Inula helenium*. Hned po škrobu je nejhojněji se vyskytujícím sacharidem v přírodě. Heterogenní směs polymerů fruktózy slouží jako zásobní sacharidy rostlin a jsou přítomny v řadě potravin rostlinného původu. Obsahuje ho například pšenice, cibule, banány, česnek, čekanka a další. Například kořen *Cichorium intybus* obsahuje kolem 15 až 20 % oligofruktózy, kdy oligofruktóza je podskupinou inulinu se stupněm polymerace ≤ 10 (Boeckner et al., 2001; Niness, 1999).

Inulin, viz obrázek 9, lze vyrábět syntézou ze sacharózy nebo extrakcí z kořenů čekanky. Z čekanky je po extrakci hydrolyzován enzymem inuláz a výsledný produkt pak obsahuje 5 % glukózy, fruktózy a sacharózy (Niness, 1999).

Inulin je ve srovnání s oligofruktózou méně rozpustný ve vodě díky delšímu řetězci. Má sladkou chuť bez přítomnosti pachutí. Používá se pro slazení nízkotučných potravin, kterým dodává vlákninu bez zhoršení organoleptických vlastností a současně zlepšuje texturu. Používá se do pomazánek a dresinků (Niness, 1999).

Po konzumaci je inulin nestravitelný, prochází do tlustého střeva, kde stimuluje růst střevních bifidobakterií. Díky tomu má velmi nízkou kalorickou hodnotu a je vhodný pro osoby s diabetem (Boeckner et al., 2001; Niness, 1999).



Obrázek 9 Vzorec inulinu

(Zdroj: Boeckner et al., 2001)

2 STANOVENÍ OBSAHU SLADIDEL V POTRAVINÁCH

Stanovení sladidel je důležité z důvodu kontroly kvality potravin, falšování potravin a pro ochranu spotřebitele. Kontrolní instituce potřebují vhodné metody pro rychlou a efektivní analýzu (Vargas et al., 2016).

Pro stanovení sladidel v potravinách lze použít různé metody jako je kapalinová chromatografie, iontová chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza, průtoková injekční analýza nebo absorpční spektrofotometrie. Tyto metody se zaměřují buďto na stanovení jednoho nebo více analytů v rámci jedné analýzy (Smrčková a Bindzar, 2014). Výhodou chromatografických metod jsou velmi přesné a spolehlivé výsledky analýz. Naopak jejich nevýhodou je nutnost speciálního zařízení, vysoce kvalifikovaných laborantů a příprava vzorků, která může být při některých analýzách časově náročná. Výťažnost chromatografických metod může být ovlivněna volbou podmínek separace, různou polaritou analyzovaných sladidel nebo jejich stabilitou během skladování. Například během skladování vzorků s obsahem aspartamu a cyklamátu při chladírenských teplotách klesá jejich obsah v důsledku degradace, oproti tomu zamražené vzorky vydrží déle stabilní. V takových případech by měla být analýza provedena co nejdříve po odběru vzorku tak, aby bylo minimalizováno jejich uchovávání v chladu. Dalším problémem je možná oxidace analytů, kterou lze vyřešit přidáním azidu sodného nebo kyseliny askorbové již při samotném odběru vzorku (Buyukgoz et al., 2015; Smrčková a Bindzar, 2014; Vargas et al., 2016).

Při použití Ramanovy a infračervené spektroskopie je za potřeby pouze jednoduchých kroků přípravy vzorků, nebo jsou vzorky analyzovány bez předchozí úpravy. Velkou výhodou těchto metod je rychlost a jednoduchost analýz (Nicoluci et al., 2023).

2.1 Metody používané pro stanovení sladidel

Acesulfam K lze stanovit kvantitativně pomocí kapalinové chromatografie v roztoku ihned po jeho filtraci. Pro případné čištění roztoku je možnost použít číření síranem zinečnatým nebo draslíkem. Dále lze použít ESI-MS (hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací) nebo HPLC_ELSD (kapalinová chromatografie s ELSD detekcí. Pro stanovení lze také použít izotachoforézu nebo spektroskopii při vlnové délce 227 nm (O'Brien-Nabors, 2016).

Pro stanovení sukralózy jsou k dispozici analytické metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), které jsou pro danou analýzu nejúčinnější. Důležitá je extrakce a rozpustnost sukralózy ve vodě a v alkoholu. V případě potřeby se další čištění vzorků sukralózy provádí pomocí extrakce na pevné fázi. Pro separaci byly využity nepolární kolony C-18 nebo s oxidem hlinitým. Při většině analýz se používá HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) s kolonou C-18 a mobilní fází 70 % vody a 30 % metanolu nebo acetonitril. Pro rychlejší a jednodušší stanovení se dá použít měření indexu lomu, který poskytuje jednoduchý způsob stanovení koncentrace sukralózy ve vodných roztocích. Index lomu roztoků sukralózy je lineární vůči koncentraci v rozsahu 3 až 50 % hm. a °Brix. Přítomnost jiných rozpustných pevných látek však ovlivňuje měření a v případě přítomnosti jiných složek je nutno použít korekční faktory (O'Brien-Nabors, 2016).

2.2 České technické normy pro stanovení sladidel

Laboratoře na analýzu potravin mnohdy využívají České technické normy stanovující podmínky, postupy a vyhodnocení stanovení sladidel. V normách je postup stanovení rozdělen podle komodit potravin například na kapalně výrobky, džemy, jogurty, sýry, pudinkové prášky, čokolády a majonézy.

ČSN EN 12856 Potraviny – Stanovení acesulfamu-K, aspartamu a sacharinu – Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

ČSN EN 12857 Potraviny – Stanovení cyklamátu – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

ČSN EN 15086 Potraviny – Stanovení isomaltu, laktitolu, maltitolu, mannitolu, sorbitolu a xylitolu v potravinách

ČSN P CEN/TS 15606 Potraviny – Stanovení acesulfamu K, aspartamu, neohesperidinu, dihydrochalconu a sacharinu – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

ČSN EN 15911 Potraviny – Simultánní stanovení devíti sladidel metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s evaporativní detekcí pomocí rozptylu světla

ČSN EN 11376 + AC Potraviny – Stanovení sacharinu ve stolních sladidlech – Spektrometrická metoda

ČSN EN 1379 + AC Potraviny – Stanovení cyklamátu a sacharinu v tekutých stolních sladidlech – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

3 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Ramanova spektroskopie patří mezi metody vibrační spektroskopie, které se zabývají identifikací a strukturní analýzou látek. Komplementární metodou k Ramanově spektroskopii je infračervená spektroskopie. Principem metody je měření intenzity a vlnových délek rozptýleného záření pozměněného v důsledku interakce fotonů s molekulami vzorku. Díky Ramanově spektroskopii lze získat informace o chemickém složení různých látek. Uplatnění tato metoda nachází téměř ve všech oblastech přírodních věd (Lukáš et al., 2013; Vargas et al., 2016).

Ramanova spektroskopie má mnoho předností. Díky možnosti měření přes sklo nebo průhledné plastové obaly nedochází ke kontaminaci vzorku, a tak je možné měření neomezeně opakovat. Analýza probíhá pomocí laseru, který nepůsobí destruktivně na vzorek. Většina vzorků jde analyzovat bez přípravy (Lukáš et al., 2013). Ramanova spektroskopie je zajímavá z pohledu rychlosti měření. Často využívaná zařízení jsou právě mobilní spektrometry, které lze použít v terénu (Vargas et al., 2016). Pro stanovení stačí malé množství vzorku, protože ke spektrometru je možné připojit optický mikroskop a izolovat částice nebo malé oblasti vzorku v řádu mikrometrů. Ramanovým spektrometrem se dají měřit plynné, kapalné, pevné, organické i anorganické látky v různé podobě. Oproti infračervené spektroskopii voda v roztocích obecně není Ramanovsky aktivní (Lukáš et al., 2013).

Mezi nevýhody Ramanovy spektroskopie patří slabý signál, proto je důležité citlivé zařízení a čistota vzorku (Lukáš et al., 2013). Ramanovy signály lze zesílit pomocí povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie SERS (Buyukgoz et al., 2015). U některých vzorků může docházet kvůli nežádoucí fluorescenci k překrytí Ramanova rozptylu (Lukáš et al., 2013).

Principem metody je ozáření vzorku monochromatickým světlem, kdy dojde k interakci mezi fotonem a molekulou. Velká část záření je rozptýlena na takzvaný Rayleighův rozptyl, který je pružný a nedochází u něj ke změně energie. Část světla se absorbuje a malé zbývající množství světla podstatného pro Ramanova spektra je rozptýleno nepružně a vzniká tak Ramanův rozptyl. Tyto fotony mají mírně rozdílné vlnové délky oproti vlnovým délkám laseru. Jsou charakteristické pro konkrétní vazby v molekulách a vznikají takzvané „otisky molekuly“. Specifické „otisky“ – části spektra pro danou látku mohou fungovat jako jakési standardy, mohou být zařazeny v knihovně

čistých látek a být použity ke srovnání při identifikaci složek vzorku (Buyukgoz et al., 2015; Lukáš et al., 2013).

Při Ramanově rozptylu se rozptýlené fotony posunou na delší vlnovou délku s nižší frekvencí. Tento posun frekvence se nazývá Stokesův posun. V případě posunu fotonů na kratší vlnovou délku o vyšší frekvenci se tento posun nazývá anti-Stokesův posun. Intenzita Stokesova posunu je vyšší než u anti-Stokesova posunu. Tyto posuny se měří jako Ramanovo spektrum. Typické spektrum zahrnuje intenzitu rozptylu jako fotony za sekundu na ose y v závislosti na rostoucí vlnové délce v nm nebo Ramanově posunu v cm^{-1} na ose x. Každý pás v Ramanově spektru odpovídá vibraci chemické vazby nebo funkční skupiny v molekule. Obecně platí, že intenzita Ramanova rozptylu je úměrná $1/\lambda^4$. Kratší excitační vlnové délky poskytují mnohem silnější rozptyl. Problémem je fluorescence, která je pravděpodobnější při použití krátkých excitačních vlnových délek. Časté vlnové délky jsou 785, 633, 532 a 473 nm (Nielsen, 2017).

Detektory v Ramanově spektrometru jsou často fotodiodová pole (PDA) nebo kamery s nábojově vázaným zařízením (CCD). CCD detektory jsou extrémně citlivé na světlo, což je důležité pro detekci slabého Ramanova signálu. Použití velmi nízkého výkonu laseru, zabráňuje tepelnému poškození či zničení vzorku (Nielsen, 2017).

FT-Ramanovy spektrometry běžně využívají blízké infračervené lasery obvykle o vlnové délce 1030 nebo 1064 nm. Jejich použití téměř zcela eliminuje fluorescenci na úkor slabé intenzity Ramanova rozptylu (Nielsen, 2017).

4 STANOVENÍ SLADIDEL POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE

Pro stanovení sladidel stejně jako u všech jiných látek je nutné znát tzv. „otisky“ zkoumaného analytu neboli pro daný analyt charakteristickou část spektra. V přítomnosti aditiv v analyzovaném vzorku je důležité, aby daná aditiva nejlépe nevykazovala charakteristické Ramanovy pásy v oblasti vlnočtů $200\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$, která je potřebná pro stanovení sladidel (Buyukgoz et al, 2015).

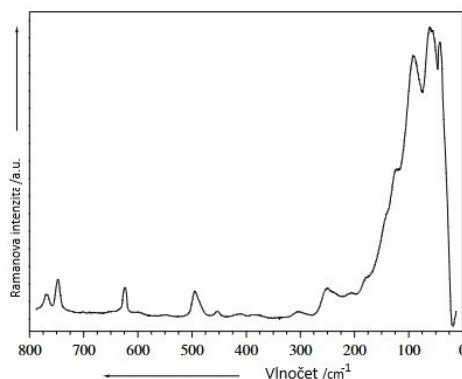
4.1 Acesulfam K

Ramanovo spektrum acesulfamu K v krystalické formě vykazuje charakteristické silné pásy při vlnočtu 547 cm^{-1} , což odpovídá deformaci vazby C-C-O a při 659 cm^{-1} , kdy dochází k vibracím vazby C-C. Středně intenzivní pás při vlnočtu 747 cm^{-1} odpovídá vibraci vazby C-C (Guven et al., 2019).

4.2 Aspartam

Ramanovo spektrum aspartamu obsahuje poměrně mnoho silných pásů. Mezi vazby a funkční skupiny důležité pro jeho spektrální charakterizaci patří monosubstituovaný benzenový kruh, kde se vibrace vazeb C-H a natahování benzenového kruhu projevuje silným pásem při vlnočtech $997\text{ až }1002\text{ cm}^{-1}$ (Buyukgoz et al., 2015). Další silné pásy má při vlnočtech $1404\text{ a }1447\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají ohýbání vazby C-OH a pásy při $1584, 1603, 1666, 1736\text{ a }1749\text{ cm}^{-1}$, které jsou způsobeny vibrací vazby CO-NH. Mezi středními pásy jsou $495, 806, 820, 1033, 1128, 1181, 1198, 1216\text{ a }1271\text{ cm}^{-1}$ odpovídající vibracím vazeb C-C, CH₂, CH₃, C=O, NH, NH₂, NH₃⁺. Slabých pásů má méně a to konkrétně $547, 1078\text{ a }1360\text{ cm}^{-1}$ s vibracemi vazeb C=O, NH, CN a NH₃⁺. Další středně intenzivní pás při 972 cm^{-1} s ramenem 960 cm^{-1} a píkem při 935 cm^{-1} jsou přiřazovány mimorovinné deformaci vazby C-H u fenylu (Peica, 2009).

Čitelné Ramanovy pásy aspartamu v krystalické formě lze získat i při nízkém vlnočtu (obrázek 10). Pík při 203 cm^{-1} odpovídá vibracím vazby N-H, píky $236\text{ a }247\text{ cm}^{-1}$ odpovídají vibraci vazeb N-H, C-H a CH₃. Ve spektru lze zaznamenat i samostatné při 452 cm^{-1} a intenzivnější pás při 495 cm^{-1} , které jsou přiřazovány vibraci vazeb NH₃ a CH₂ (Peica, 2009).

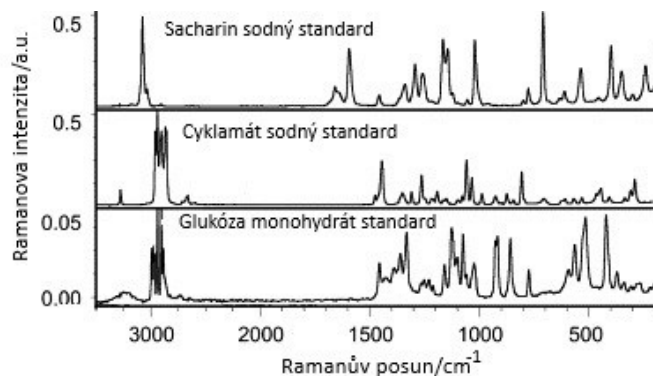


Obrázek 10 Ramanovo spektrum krystalického aspartamu v oblasti nízkých vlnočtů

(zdroj: Peica, 2009)

4.3 Cyklamát

V Ramanových spektrech cyklamátu (obrázek 11) je silný pás v oblasti vlnočtů 2850 až 2960 cm^{-1} . Střední pásy jsou způsobeny vibrací vazby CH_2 při vlnočtech 806, 1264 a 1445 cm^{-1} . Další charakteristický pás odpovídající vibraci vazby S-O představují píky při 1033 a 1058 cm^{-1} (Armenta et al., 2004).

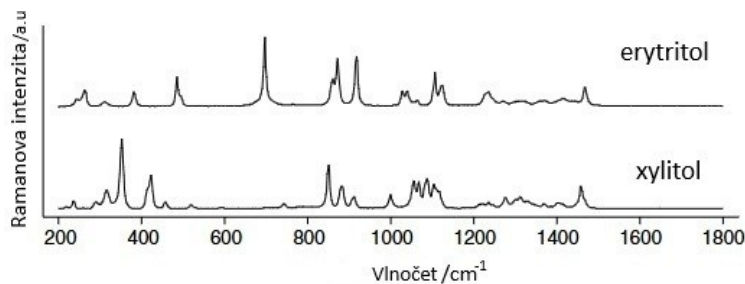


Obrázek 11 Ramanova spektra standardů sacharinu sodného, cyklamátu sodného a monohydrátu glukózy

(zdroj: Armenta et al., 2004)

4.4 Erytritol

Ramanovo spektrum erytritolu je zobrazeno na obrázku 12. Jsou zde významné píky v rozmezí vlnočtů 430 až 500 cm^{-1} , 800 až 900 cm^{-1} s hlavními píky 700, 865 a 698 cm^{-1} s roztažnou vibrací OH skupiny. Dále se pak projevuje vibrace vazeb skupiny CCO v oblasti vlnočtů 1000 až 1150 cm^{-1} s hlavním píkem při 1046 cm^{-1} (De Veij et al., 2009; Mignani et al., 2014).



Obrázek 12 Ramanovo spektrum erytritolu a xylitolu

(zdroj: De Veij et al., 2009)

4.5 Sacharin

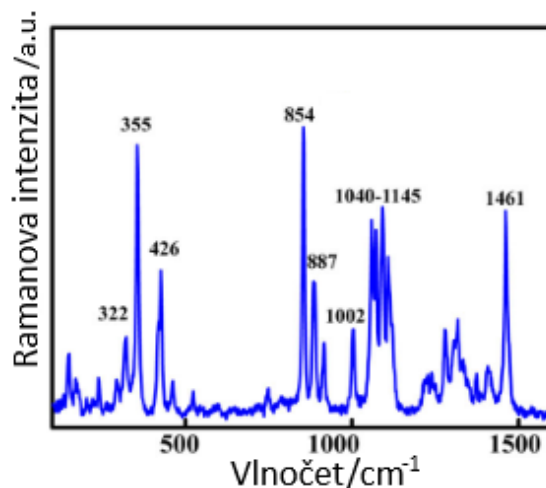
Ramanovo spektrum sacharinu vykazuje silný pás pouze při vlnočtu 704 cm^{-1} , který je spojený s vibracemi vazeb C-S a C-C. Střední pás je u vlnočtu 523 cm^{-1} s vibrací vazeb C-C-O, pík 697 cm^{-1} , odpovídá protahování vazby C-S a prstencovým vibracím, pík 1018 cm^{-1} je přiřazován protahovací vibraci vazeb C-C, C-S a také prstencové vibraci, která se zobrazuje u cyklických struktur a pík 1179 cm^{-1} odpovídá deformaci C-H vazeb a vazeb C-C. Ve spektru lze nalézt slabé pásy při vlnočtu 777 cm^{-1} odpovídající vibraci vazeb C-H, C-S a C-C, pík 1595 cm^{-1} pro vibrace C-C a C=C vazeb a pík 1698 cm^{-1} také pro vibrace vazeb C=C, ale i s C=O. Další důležitý pás je při 1176 cm^{-1} a je přiřazován asymetrickému protahování vazby SO_2 (Guyen et al., 2019; Karunathilaka et al., 2017).

4.6 Sukralóza

Ramanovo spektrum sukralózy obsahuje dva silné pásy o vlnočtu 624 a 775 cm^{-1} odpovídající vibracím vazeb C-Cl a C-C. Dále obsahuje další čtyři střední pásy: pík při vlnočtu 536 cm^{-1} , odpovídá vibracím vazby C-C-O a píky o vlnočtech 664 , 710 a 475 cm^{-1} odpovídají vibracím vazeb C-Cl a C-C (Guyen et al., 2019).

4.7 Xylitol

Ramanova spektra xylitolu (obrázky 12 a 13) ukazují charakteristické pásy. Při nízkých vlnočtech 332 , 355 a 426 cm^{-1} jsou zaznamenány píky odpovídající vibraci skeletu sloučeniny. Vibrace vazeb C-C a C-C-O jsou znatelné při vlnočtu 854 , 887 , 916 a 1002 cm^{-1} . Vibrace vazby C-O jsou viditelné jako píky při vlnočtu 1061 , 1073 , 1091 , 1113 cm^{-1} . Deformační vibrace CH_2 skupiny je vidět jako pík při vlnočtu 1461 cm^{-1} (De Veij et al., 2009; Zhang et al., 2023).



Obrázek 13 Ramanovo spektrum xylitolu

(zdroj: (Zhang et al., 2023))

4.8 Inulin

Ramanovo spektrum polymeru inulinu v jeho krystalické podobě obsahuje v oblasti nízkých vlnových délek středně silný pás při 363 cm^{-1} odpovídající deformační vibraci vazeb H-CH a deformační vibraci vazby OH v blízkosti první fruktózy jednotky. Silný pás při 533 cm^{-1} je přiřazován deformaci glukózy prstence. V oblasti vlnových délek mezi 599 a 833 cm^{-1} dominují pásy ohybových vazebných vibrací skupin C-C-C, O-C-O a CH cyklických struktur inulinu. Nejintenzivnější pásy jsou při 1028 a 1050 cm^{-1} odpovídající protahování vazby CO a pás při 2934 cm^{-1} je připisován symetrickým a asymetrickým protahovacím vibracím HCH (Balan et al., 2018).

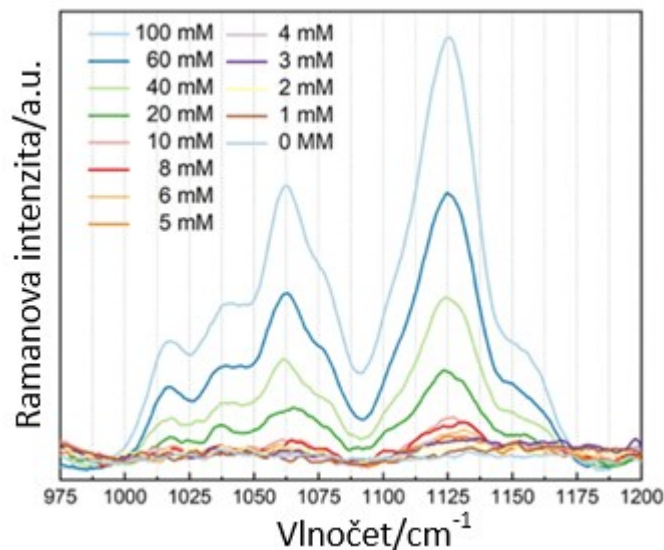
4.9 D-fruktóza

V Ramanově spektru D-fruktózy se převážně zobrazují vibrace vazeb C-C-O a C-C, a to konkrétně při vlnových délkách $525, 594, 627, 818, 872, 926, 978, 1081\text{ cm}^{-1}$ (Güven et al., 2019).

4.10 D-glukóza

Ramanovo spektrum D-glukózy obvykle obsahuje píky odpovídající protahovací vibraci vazeb CC a CO, ohybové deformace vazeb CCC, CCO a OCO i vibrace pyranového prstence, které se zobrazují jako píky v rozsahu vlnových délek 400 až 900 cm^{-1} . Pásky pod 700 cm^{-1} jsou přiřazovány vibracím krystalové mřížky. Vyšší píky 900 až 1500 cm^{-1} jsou připisovány vibracím atomů a skupin připojených k uhlíkové kostře

sloučeniny (Zheng et al., 2023). Hlavní pásy při vlnočtu 437, 518, 1060, 1125, 1365 a 1461 cm^{-1} byly také použity pro kvantitativní stanovení glukózy v roztoku viz obrázek 14 (Golparvar et al., 2021).



Obrázek 14 Ramanovo spektrum glukózy v roztoku při různých koncentracích

(zdroj: Golparvar et al., 2021)

4.11 Sacharóza

V Ramanově spektru sacharózy je jeden silný pás při vlnočtu 850 cm^{-1} odpovídající vibracím vazeb C-O-C a C-C. Střední pás 525 cm^{-1} , který je zároveň jedním z hlavních odpovídá vibraci vazby C-C-. Pás při 640 cm^{-1} je přiřazován vibraci vazby C-C. Další důležité pásy jsou při 547 , 638 a 835 cm^{-1} . Slabé pásy má sacharóza při 922 , 1039 a 1124 cm^{-1} a odpovídají vibracím vazeb C-C-O a C-C (Guyen et al., 2019; Mignani et al., 2014).

II PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo použití Ramanovy spektroskopie pro detekci vybraných sladidel samostatně, ve směsi a v komerčně dostupných nápojích.

Cílem teoretické části práce bylo:

- uvést základní charakteristiku vybraných sladidel
- v odborné literatuře dohledat Ramanova spektra sladidel a popsat hlavní píky ve spektrech

Cílem praktické části práce bylo:

- naměřit a vyhodnotit Ramanova spektra vybraných sladidel v krystalické formě
- naměřit a vyhodnotit spektra vybraných sladidel ve směsi
- detekovat vybraná sladidla přímo v nízkokalorických nápojích

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Sladidla ve formě prášků

Acesulfam K – Sigma-Aldrich (Merck Life Science spol. s r.o., ČR)

Aspartam (F&N dodavatelé, s.r.o., ČR)

- Složení: citronany sodné, hydrogenuhličitan sodný, erytritol, aspartam 15 %, acesulfam K 15 %, mikrokrytalická celulóza a stearan hořečnatý

Cyklamát (F&N dodavatelé, s.r.o., ČR)

- Složení: kyselina cyklámová a její soli 60 %, sacharin sodný 15 %, hydrogenuhličitan sodný, citronany sodné

D-fruktóza (Ing. Petr Lukeš, ČR)

- čistota p.a. s obsahem 99,9 % D-fruktózy

D(+)-glukóza monohydrát (Merck Life Science spol. s r.o., ČR)

Erytritol (Allnature, s.r.o., ČR)

- Složení: 100 % erytritol

Inulin (F&N dodavatelé, s.r.o., ČR)

- Složení: 99 % inulin, steviol-glykosid 1 %

Sacharin (F&N dodavatelé, s.r.o., ČR)

- Složení: hydrogenuhličitan sodný, kyselina vinná, sacharin sodný 25 %

Sacharóza (Erba Lachema s.r.o., ČR)

Sukralóza (F&N dodavatelé, s.r.o., ČR)

- Složení: erytritol, citran sodný, hydrogenuhličitan sodný, sukralóza 9 %, mikrokrytalická celulóza, stearan hořečnatý

Xylitol (Allnature, s.r.o., ČR)

- Složení: 100 % xylitol

6.2 Nápoje s obsahem sladidel

Nealkoholické sycené a nesycené limonády slazené sladidly (obrázek 15).

Schweppes INDIAN TONIC (Mattoni 1873 a.s., ČR)

- Složení: voda, cukr, oxid uhličitý, kyselina citronová, přírodní aroma chinin, sukralóza, acesulfam K

Kinley Zero TONIC WATER (Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., ČR)

- Složení: voda, oxid uhličitý, kyselina citronová, přírodní aroma citrusů a další včetně chininu, acesulfam K, sukralóza

7UP ZERO SUGAR (KMV BEV CZ s.r.o., ČR)

- Složení: voda, oxid uhličitý, kyselina citronová a kyselina jablečná, přírodní citronové a limetové aroma, citronany sodné, benzoan sodný, aspartam, acesulfam K

MAGNESIUM CARNITINE ACTIVITY DRINK (NUTREND D.S., a.s., ČR)

- Složení: voda, polydextróza, kyselina citronová, citronan hořečnatý – Aquamin, oxid uhličitý, L-karnitin, aroma, sorban draselný, benzoan sodný, acesulfam K, sukralóza, pyridoxin hydrochlorid

LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO (OSHEE Polska Sp. z o.o., PL)

- Složení: pitná voda, kyselina citronová, citronany sodné, přírodní citronovo-limetkové aroma, kyselina cyklámová, sachariny, niacin, vitamin B6, laktát zinečnatý, kyselina l-askorbová

Aloe Vera ZERO (Lidl Česká republika v.o.s., ČR)

- Složení: pitná voda, aloe vera 30 %, kyselina citronová, aroma, citronany sodné, mléčnan vápenatý, kyselina cyklámová a její sodné a vápenaté soli, sacharin a jeho sodné, draselné a vápenaté soli, aspartam, acesulfam K, guma gellan

Coca Cola ZERO CUKRU (Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o., ČR)

- Složení: voda, oxid uhličitý, barvivo E150d, cyklamát sodný, acesulfam K, aspartam, kyselina fosforečná, přírodní aromata, aroma kofein, citronany sodné



Obrázek 15 Vzorky nápojů

(1 - Schweppes INDIAN TONIC, 2 - Kinley Zero TONIC WATER, 3 - 7UP ZERO SUGAR, 4 - MAGNESIUM CARNITINE ACTIVITY DRINK, 5 - LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO, 6 - Aloe Vera ZERO, 7 - Coca Cola ZERO CUKRU)

(Zdroj: vlastní)

6.3 Chemikálie

- Aktivní uhlí 0,5-1,0 mm (Merck Life Science spol. s r.o., ČR)
- Destilovaná voda

6.4 Přístroje a zařízení

Pro přípravu vzorků bylo využito vybavení laboratoří Ústavu analýzy a chemie potravin a měření spekter vzorků probíhalo na Ústavu elektroniky a měření (Fakulta aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně).

- Analytická váha KERN, AES, 220 4 (KERN&SOHN, DE)
- Vodní lázeň MEMMERT WB 14 (GmbH+Co.KG, DE)
- Ultrazvuková lázeň ULTRASONIC COMPACT CLEANER PS04000A (NOTUS – POWERSONIC s.r.o., SK)
- Laboratorní sklo

6.4.1 Ramanův spektrometr

Pro měření spekter vzorků byl použit Ramanův spektrometr i-Raman Plus model BWS465-785S (B&W Tek, Inc., New Jersey, USA), viz obrázek 16. Součástí zařízení byl detektor typu CCD pole s vysokou kvantovou účinností, laser s vlnovou délkou 785 nm s dobou integrace 100 ms až 30 min. K zařízení patří sonda na měření kapalných vzorků ve vialkách (obrázek 17) a přítlačná sonda na měření pevných látek (obrázek 18).



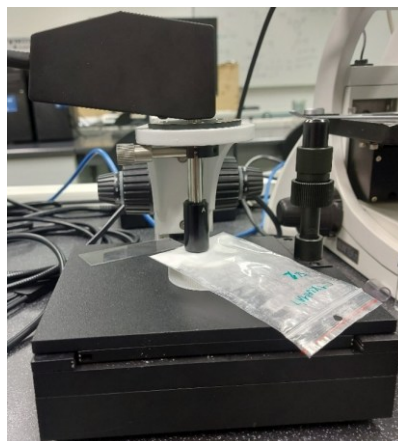
Obrázek 16 Ramanův spektrometr i-Raman Plus

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 17 Sonda na měření kapalných vzorků

(Zdroj: vlastní)

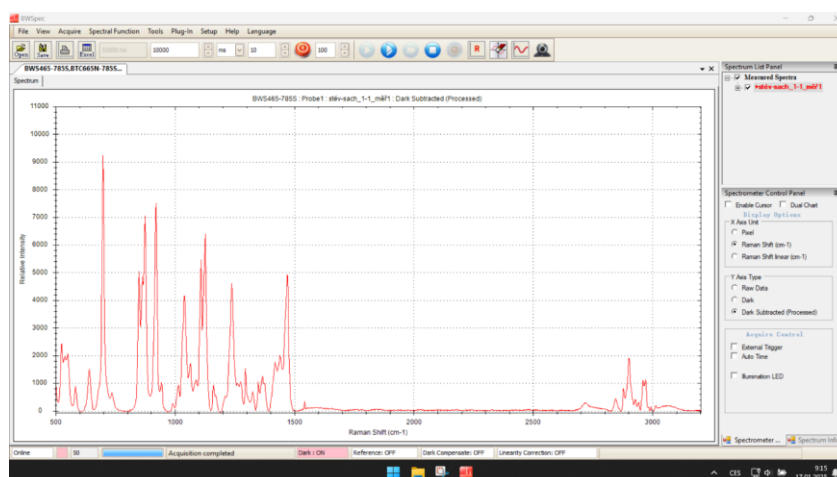


Obrázek 18 Sonda přitlačná

(Zdroj: vlastní)

6.4.2 Software pro zobrazení naměřených dat

Pro zobrazení naměřených hodnot byl použit software BWSpec (B&W Tek, Inc., New Jersey, USA), viz obrázek 19. Jedná se o obecný spektroskopický software, který slouží pro ovládání měření a sběr naměřených dat. Je součástí všech Ramanových spektrometrů od této společnosti. Umožňuje optimalizovat parametry měření, jako je doba integrace, počet opakování měření a řízení výstupního výkonu laseru. Nabízí také nástroje pro práci s naměřenými daty, například spektrální vyhlazování nebo korekci základní linie spektra. Tento software byl použit pouze na práci s přístrojem a získání naměřených dat.



Obrázek 19 Software BWSpec

(Zdroj: vlastní)

6.5 Měření spekter práškových vzorků sladidel

Měření probíhalo při laboratorní teplotě na Ramanově spektrometru i-Raman Plus při vlnové délce excitačního laseru 785 nm. Podmínky měření byly nastaveny na 100% účinnost laseru, expoziční čas 10 s, opakování měření 10x, celková doba osvitů vzorku 100 s. Spektra byla měřena v rozsahu vlnočtů $484\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením $3,5\text{ cm}^{-1}$.

Sladidla (acesulfam K, aspartam, cyklamát, erytritol, inulin, sacharin, sukralóza a xylitol) a také D-fruktóza, D-glukóza a sacharóza v krystalické podobě byla měřena bez předchozí úpravy v polyethylenovém obalu, viz obrázek 20. Polyethylenový obal se vzorkem se umístil pod přítlačnou sondu, která byla připevněná ve vertikálním držáku (obrázek 18) a mířila směrem dolů na vzorek. U sondy byl upraven přtlak tak, aby docházelo ke kompresi vzorku mezi optickou sondou a podložkou, čímž se vytvořilo vhodné tmavé prostředí pro detekci Ramanova signálu (I-Raman Plus Quick Start Guide, 2018).



Obrázek 20 Sladidla v krystalické formě

(zdroj: vlastní)

6.6 Měření spekter směsí sladidel

Vícesložkové směsi dvou nebo tří různých sladidel v krystalické formě byly připraveny smícháním sladidel v poměrech uvedených v tabulce 1. Směsi sladidel byly rozdrceny ve třecí misce na prášek a homogenizovány. Stejným způsobem byly připraveny směsi s rostoucím obsahem xylitolu o obsahu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 g na 1 g D-glukózy a směsi s rostoucím obsahem erytritolu o obsahu 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 g na 1 g D-fruktózy.

Všechny tyto připravené práškové vzorky byly vloženy do PE obalu a měřeny pomocí přítlačné sondy za podmínek popsanych v kap. 6.5.

Tabulka 1 Přehled směsí sladidel a jejich vzájemného poměru

Směs	Poměr
xylitol : acesulfam K	1:0,1
inulin : D-glukóza	1:1
inulin : D-glukóza: acesulfam K	1:1:0,1
xylitol : erytritol: sacharóza	1:1:1

(Zdroj: vlastní)

6.7 Měření spekter sladidel v roztoku

Pro měření sladidel v roztoku byly připraveny vodné roztoky acesulfamu K a cyklamátu o koncentraci 1 mg/ml. Roztoky sladidel byly měřeny ve skleněných kulatých kyvetách o objemu 5 ml pomocí sondy pro měření kapalných vzorků (obrázek 17). Připravený vzorek v kyvetě byl umístěn do měřicí cely, kam byla připojena optická sonda. Odstínění okolního světla bylo důležité pro zvýšení citlivosti detekce a zvýšení čistoty signálu (I-Raman Plus Quick Start Guide, 2018). Podmínky měření byly nastaveny shodně s postupem v kap. 6.5

6.8 Měření spekter sladidel z odpařených roztoků

Pro přípravu roztoků s konstantním obsahem sacharózy a rostoucím obsahem acesulfamu K byl připraven zásobní roztok acesulfamu K v koncentraci 1 g/100 ml. Ředěním tohoto zásobního roztoku byla připravena řada roztoků s obsahem acesulfamu K 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 mg/100 ml a současně byla přidána sacharóza na výslednou koncentraci 1 g/100 ml. Takto připravené roztoky se důkladně promíchaly a na vodní lázni v keramických odpařovacích miskách se z roztoků odpařila kapalná fáze. Po odpaření se odparky seškrábly do polyethylenového obalu.

Měření spektra z odparků probíhalo pomocí přítlačné sondy za podmínek dle kap. 6.5.

6.9 Měření sladidel v nápojích

Před měřením spekter nápojů byly provedeny úpravy nápojů pro odstranění oxidu uhličitého, příp. pevných částí a barviv. U sycených nápojů byl oxid uhličitý odstraněn pomocí ultrazvuku po dobu 30 minut při teplotě 22 °C.

Nápoj Aloe Vera byl přefiltrován přes filtrační papír pro odstranění pevných rostlinných částí a získání čirého roztoku.

U nápoje Coca Cola bylo barvivo odstraněno pomocí aktivního uhlí a následné filtrace. Barvivo karamel E150d bylo nutné ze vzorku odstranit, protože může silně fluoreskovat a přehlušit Ramanův signál.

Takto připravené vzorky byly přelity do skleněných kyvet (obrázek 21) a měřeny pomocí sondy na kapalné vzorky za podmínek shodných s kap. 6.5.



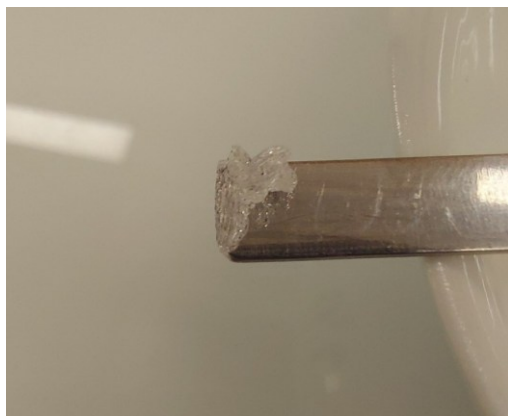
Obrázek 21 Skleněné kyvety pro Ramanův spektrometr

(zdroj: vlastní)

6.10 Měření sladidel v nápojích po odpaření

Pro získání kvalitnějších spekter byly vzorky měřeny také v pevné formě (obrázek 22) po odpaření vody. Odpaření vody bylo provedeno pomocí vodní lázně v keramických odpařovacích miskách při 50 °C. Objem odpařovaného vzorku byl 20 ml.

Takto získané odparky byly vloženy do PE obalu a měřeny pomocí přítlačné sondy za podmínek dle kap. 6.5.



Obrázek 22 Odparky získané po odpaření kapalné fáze nápojů

(Zdroj: vlastní)

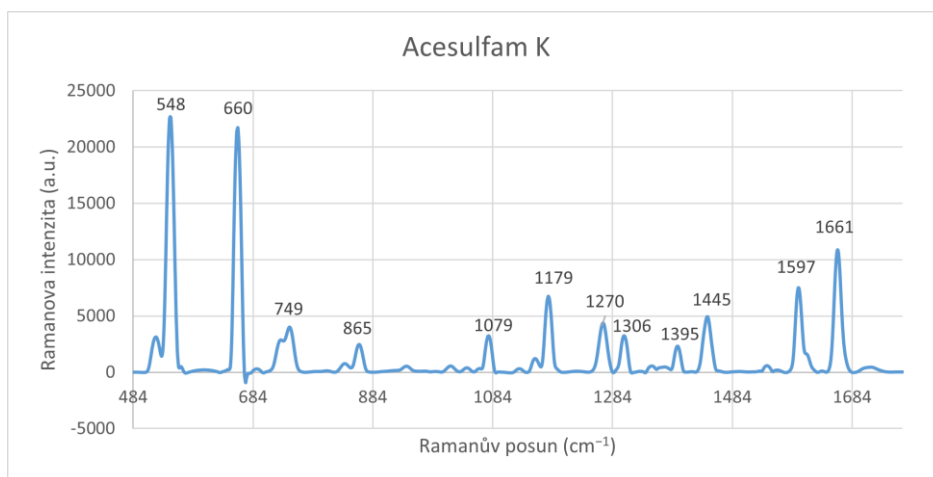
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Byla získána Ramanova spektra krystalických sladidel a následně byla tato spektra porovnána se spektry těchto sladidel ve směsích a také se spektry vybraných, nízkokalorických nápojů.

7.1 Ramanova spektra sladidel

Pro získání spektra **acesulfamu K** byl proměřen jeho standard. Spektrum obsahuje dva silné pásy při vlnočtech 548 a 660 cm^{-1} , pásy střední intenzity byly zaznamenány u vlnočtů 1179, 1597 a 1661 cm^{-1} a jsou zde zřetelné další slabé pásy (obrázek 23). Po porovnání spektra s odbornou literaturou lze k těmto pásům přiřadit vazby následovně: silné pásy 548 a 660 cm^{-1} odpovídají vibračním vazeb C-C-O, C-CH₃ a C-C, střední pás při 749 cm^{-1} odpovídá vibraci vazby C-C (Guyen et al., 2019).

Další pásy střední a slabé intenzity by bylo možné přiřadit dle dostupné literatury takto: střední pás 1661 cm^{-1} (C=C), střední pás 1179 cm^{-1} (C-O), pík 1270 cm^{-1} (C-N), 1445 a 1597 cm^{-1} (C=C), slabé pásy 865 cm^{-1} (C-C-O), 1079 cm^{-1} (C-O), 1306 cm^{-1} (C-N) a 1395 cm^{-1} (C=C) (Novotná et al., 2011).

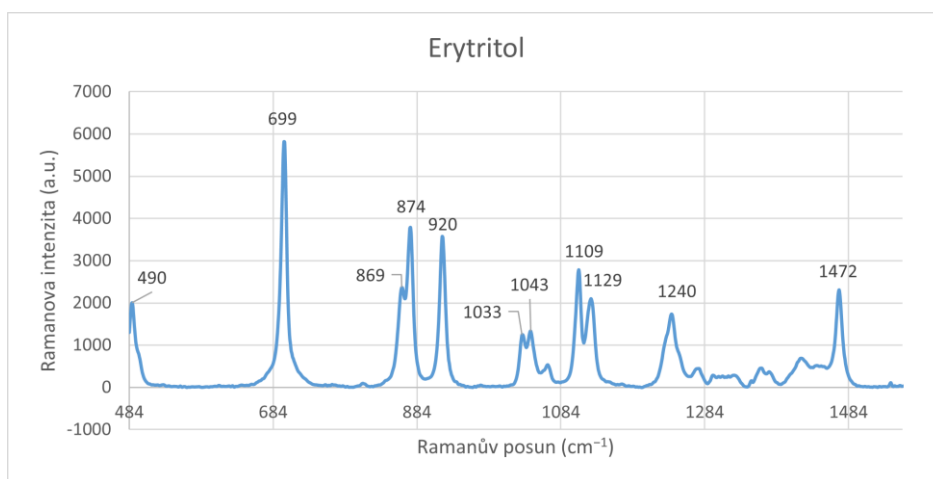


Obrázek 23 Ramanovo spektrum acesulfamu K

(Zdroj: vlastní)

Erytritol bez obsahu dalších látek poskytl dobře čitelné Ramanovo spektrum (obrázek 24). Pás s největší intenzitou při vlnočtu 699 cm^{-1} lze přiřadit vibraci vazby O-H a jeho poloha přesně odpovídá informacím v literatuře (De Veij et al., 2009; Mignani et al., 2014). Velmi dobře odpovídají polohou také střední pásy vlnočtů 490, 869, 874, 920, 1109 a 1129 cm^{-1} , které jsou přiřazovány vibračním vazeb C-C skeletu sloučeniny

a vazbám C-OH, kde jsou označeny jako silné (Novotná et al., 2011). Další středně intenzivní pás byl naměřený v poloze 1472 cm^{-1} . Slabé pásy se objevují u vlnočtů 1033 , 1043 a 1240 cm^{-1} a také odpovídající vazbám C-OH (Novotná et al., 2011). Hlavní pásy měly být podle (De Veij et al., 2009; Mignani et al., 2014) při 700 cm^{-1} a ve spektru tomu odpovídá nejintenzivnější pás při vlnočtu 699 cm^{-1} . Další silný pík měl být dle literatury při 865 cm^{-1} , kterému odpovídá střední pík 869 cm^{-1} a poslední charakteristický pás měl při 1046 cm^{-1} , kterému odpovídá slabý pík 1043 cm^{-1} .



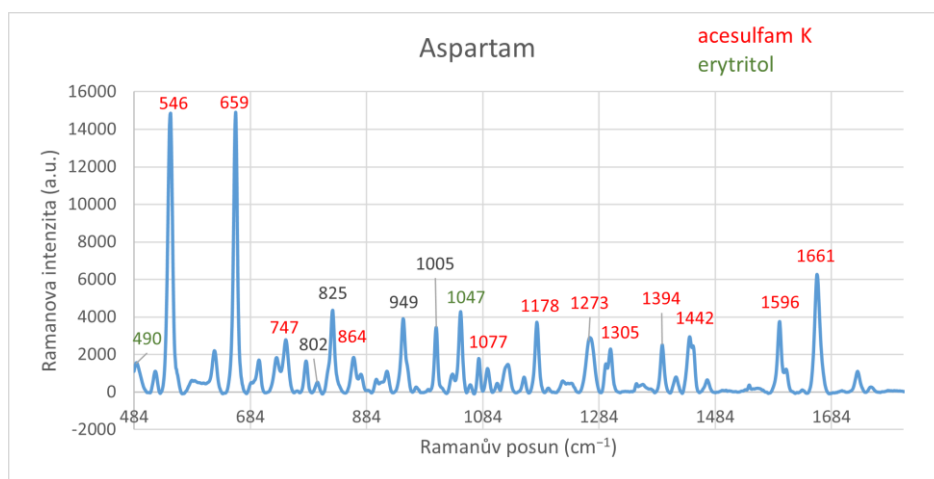
Obrázek 24 Ramanovo spektrum erytritolu

(Zdroj: vlastní)

Aspartam jako komerční sladidlo obsahoval mimo aspartam (15 %) i jiné složky a sladidla. Dle výrobce byl v tomto sladidle obsažen z 15 % acesulfam K, jehož spektrum (obrázek 23), lze od výsledného spektra odečíst. Píky, které lze ve spektru pro aspartam přiřadit acesulfamu jsou zaznačeny červeně (obrázek 25). Jedná se o píky při vlnočtech 546 a 659 cm^{-1} a dále i pásy 747 , 864 , 1077 , 1178 , 1273 , 1305 , 1394 , 1442 , 1596 a 1661 cm^{-1} . Píky charakteristické pro erytritol (spektrum na obrázku 24) lze také od aspartamu odečíst, proto jsou pásy odpovídající erytritolu při vlnočtech 490 a 1047 cm^{-1} a jsou ve spektru na obrázku 25 označeny zeleně.

Po odečtení píků odpovídajících acesulfamu a erytritolu lze aspartamu přiřadit tři charakteristické píky 825 , 949 a 1005 cm^{-1} . Pás při vlnočtu 1005 cm^{-1} lze přiřadit vibraci fenylu, jakožto charakteristické skupiny aspartamu, která se podle publikací zobrazuje v oblasti vlnočtů 997 až 1002 cm^{-1} (Buyukgoz et al, 2015). Pík při 825 cm^{-1} může odpovídat střednímu píku při 820 cm^{-1} s malým ramenem při 806 cm^{-1} z publikace (Peica, 2009). Poloha naměřeného píku je lehce posunutá k vyšším vlnočtům, ale sousedí s malým

ramenem píku při 802 cm^{-1} . Tyto pásy mohou být přiřazeny deformaci vazeb CO, NH a ohybové vibraci vazby NH_2 . Stejnými autory je interpretován středně intenzivní pás při 972 cm^{-1} s ramenem 960 cm^{-1} a píkem při 935 cm^{-1} . Při zohlednění možných posunů a změny intenzit pásů díky přítomnosti jiných látek se dá usuzovat, že pás 949 cm^{-1} odpovídá pásu 960 cm^{-1} , kdy z pravé strany sousedí s velmi malým píkem 972 cm^{-1} a z levé strany sousedí s píkem 922 cm^{-1} . Tyto pásy jsou v téže publikaci přiřazovány k mimorovinné deformaci vazby C-H u fenylu (Peica, 2009).



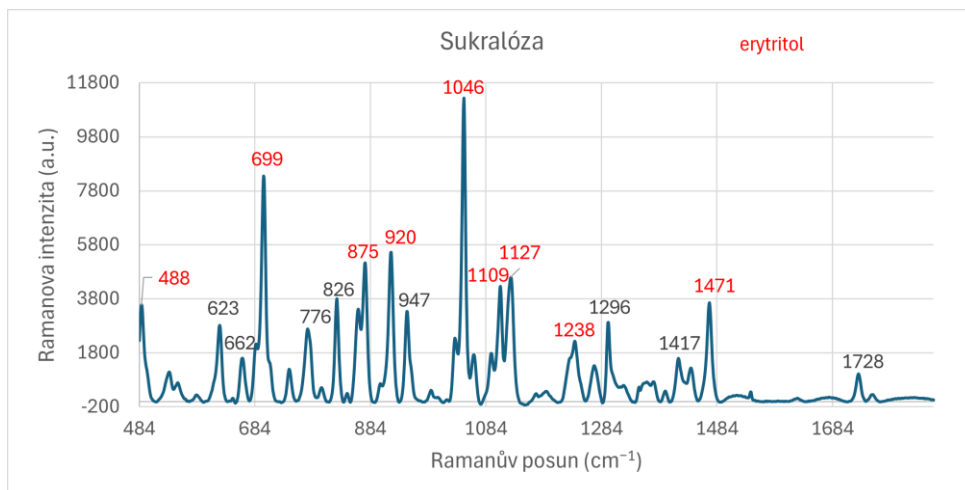
Obrázek 25 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem aspartamu, acesulfamu a erytritolu

(Zdroj: vlastní)

Sladidlo s obsahem **sukralózy** obsahuje erytritol a pouze z 9 % sukralózu. V naměřeném spektru (obrázek 26) jsou píky charakteristické pro erytritol (odečtené ze spektra na obrázku 24) označené červeně a odpovídají mu píky 488 , 699 , 875 , 920 , 1033 , 1046 , 1109 , 1127 , 1238 a 1471 cm^{-1} .

Srovnáním těchto píků s Ramanovým spektrem sukralózy podle (Guven et al., 2019) byla zjištěna shoda u vlnočtů 538 , 662 , 711 a 745 cm^{-1} pro středně silné pásy a silné pásy při 623 a 776 cm^{-1} . V této odborné studii byl posun 538 cm^{-1} přiřazen vibraci vazby CCO a zbylé posuny jsou spojovány s vibracemi vazeb C-Cl a C-C.

Další naměřené silné pásy ve spektru odpovídají vlnočtům 826 cm^{-1} (CCO), 947 cm^{-1} (CO) a 1296 cm^{-1} (OH) (Novotná et al., 2011).

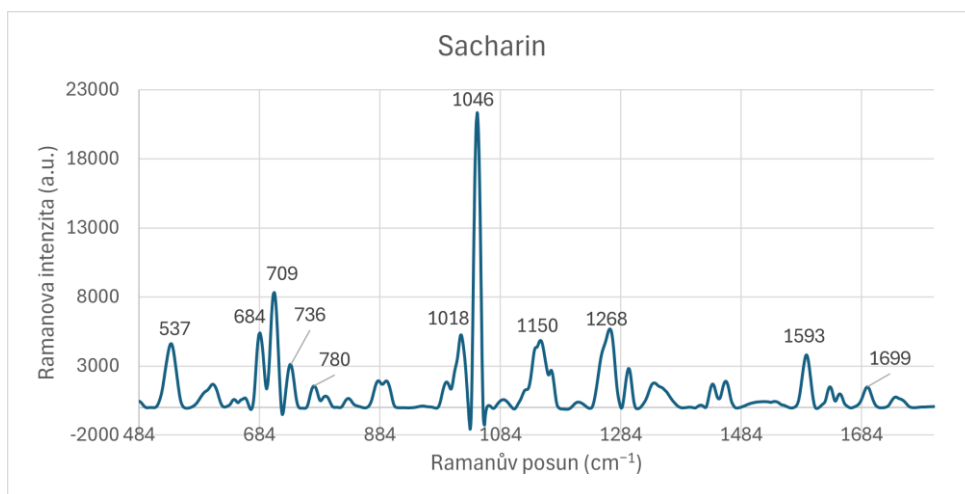


Obrázek 26 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem sukralózy

(Zdroj: vlastní)

Sacharin měl v Ramanově spektru (obrázek 27) silný pás 709 cm^{-1} , který odpovídá vlnotům publikovaným v literatuře (Guven et al., 2019; Karunathilaka et al., 2017). Mimo něj je ve spektru mnohem silnější pás 1046 cm^{-1} , který může podle (Han et al., 2017) odpovídat vibraci vazby $\text{O} = \text{S} = \text{O}$ sacharinu. Vzhledem k obsahu hydrogenuhlíčitanu draselného v tabletě sacharinu by k intenzitě pásu při tomto vlnočtu mohla přispět také vibrace vazby C-OH (Frantz, 1998).

Další pásy ve spektru se shodují s údaji v literatuře přiřazované sacharinu. Jedná se o střední pásy 537 , 684 , 1018 a 1150 cm^{-1} , pásy s nízkou intenzitou 736 , 780 , 1593 a 1699 cm^{-1} (Guven et al., 2019; Karunathilaka et al., 2017).

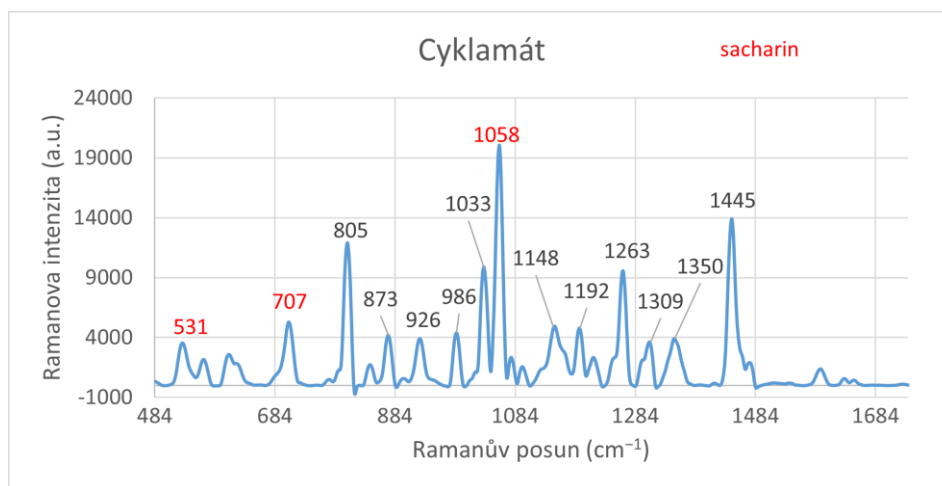


Obrázek 27 Ramanovo spektrum sladidla se sacharinem

(Zdroj: vlastní)

Cyklamát ve formě kyseliny cyklamové je ve vzorku sladidla obsažen z 60 % a současně je obsažen také sacharin sodný z 15 %. V Ramanově spektru (obrázek 28) jsou píky, které byly nalezeny také ve spektru sacharinu, označeny červenou barvou. Jedná se o píky 531, 707 a 1058 cm^{-1} (viz spektrum sacharinu na obrázku 27), kdy pás 1058 cm^{-1} může také současně odpovídat vibraci vazby S-O cyklamové kyseliny podle studie (Armenta et al., 2004). Při porovnání dalších naměřených píků ve spektru cyklamátu s literaturou jsou polohy naměřených píků velmi podobné. Patří mezi ně střední pásy 805 cm^{-1} s vibrací vazby CH_2 , dále vibrace vazby S-O při vlnočtu 1033 cm^{-1} a vibrace vazeb CH_2 při vlnočtech 1263 a 1445 cm^{-1} .

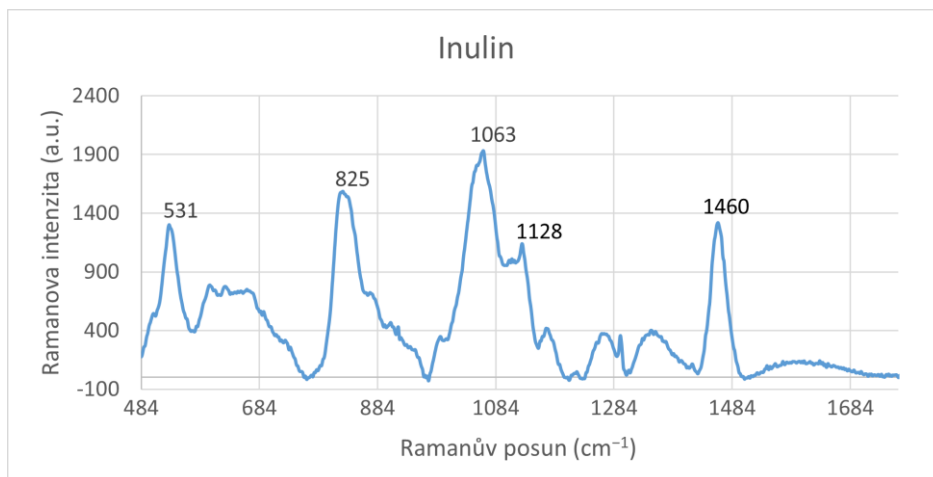
Další naměřené slabé pásy 873, 926, 986, 1148, 1192, 1309 a 1350 cm^{-1} by měly být způsobeny vibracemi vazby C-N (Novotná et al., 2011).



Obrázek 28 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem cyklamátu

(Zdroj: vlastní)

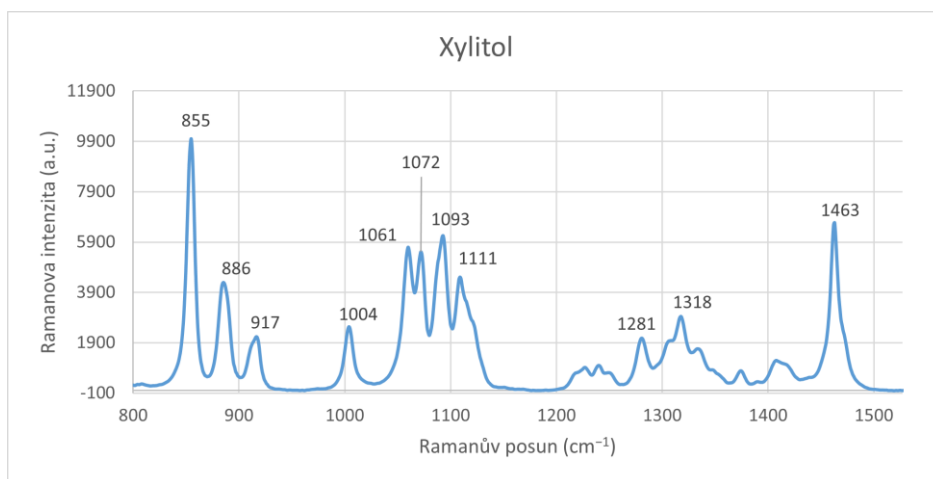
Inulin, obsahující pouze z 1 % steviol-glykosid, měl v Ramanově spektru (obrázek 29) naměřené silné pásy 531 cm^{-1} odpovídající deformacím glukózového prstence, 825 cm^{-1} způsobený vibracemi skupin C-C-C, O-C-O a CH a 1063 cm^{-1} jako nejintenzivnější pás zapříčiněný protahované deformací vazby CO. Tyto pásy se s mírnými posuny shodují s polohami v odborné literatuře (Balan et al., 2018). Naměřeny byly také další dva výrazné pásy. Silnější pás při 1460 cm^{-1} charakteristický pro vibrace vazby HCH a o něco málo slabší pás při 1128 cm^{-1} související s vibracemi vazeb CCO, OH a CH (Balan et al., 2018).



Obrázek 29 Ramanovo spektrum inulinu

(Zdroj: vlastní)

Ramanovo spektrum **xylitolu** (obrázek 30) obsahuje píky velmi dobře korespondující s dostupnou literaturou. Polohy píků odpovídají vlnočtům 855, 886, 917, 1004 cm⁻¹ byly přiřazeny vibraci vazeb C-C a C-C-O, pásy s vlnočtem 1061, 1072, 1093, 1111 cm⁻¹ byly přiřazeny vibraci vazby C-O a pík 1463 cm⁻¹ byl přiřazen vibraci CH₂ (De Veij et al., 2009; Zhang et al., 2023).



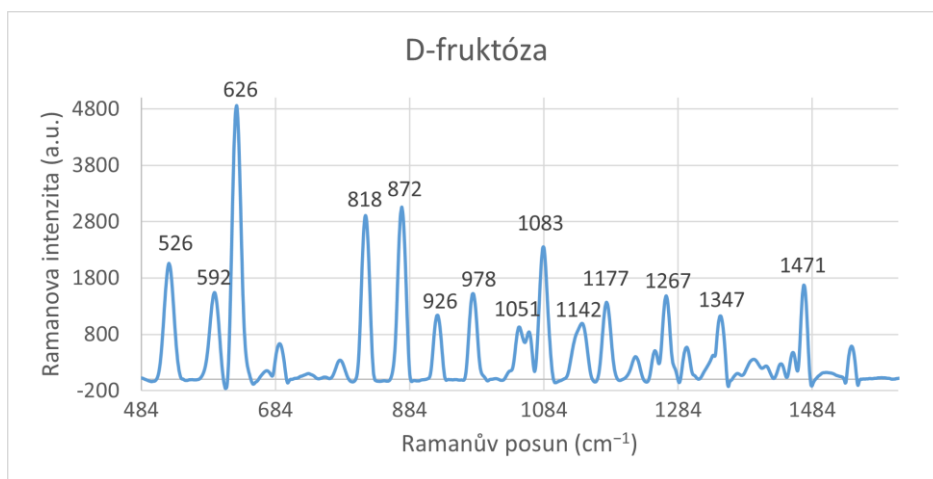
Obrázek 30 Ramanovo spektrum xylitolu

(Zdroj: vlastní)

Protože se v některých potravinách a nápojích využívá kombinace umělých sladidel s cukry, byla proměřena i spektra D-fruktózy, D-glukózy a sacharózy.

V Ramanově spektru **D-fruktózy** (obrázek 31) je výrazný silný pík při 626 cm^{-1} odpovídající vazbě C-C. Střední pásy o vlnočtech 526 cm^{-1} byly přiřazeny vibraci vazeb C-C-O, pásy $818, 872, 1083\text{ cm}^{-1}$ odpovídají vibraci vazeb C-O-C a C-C. Další slabé pásy byly přiřazeny takto: pás 592 cm^{-1} vibraci C-C-O, pás 926 cm^{-1} vibraci C-O-C a C-C a pás 978 cm^{-1} vibraci C-C. Polohy píků korespondují s publikovanými daty dle (Guyen et al., 2019).

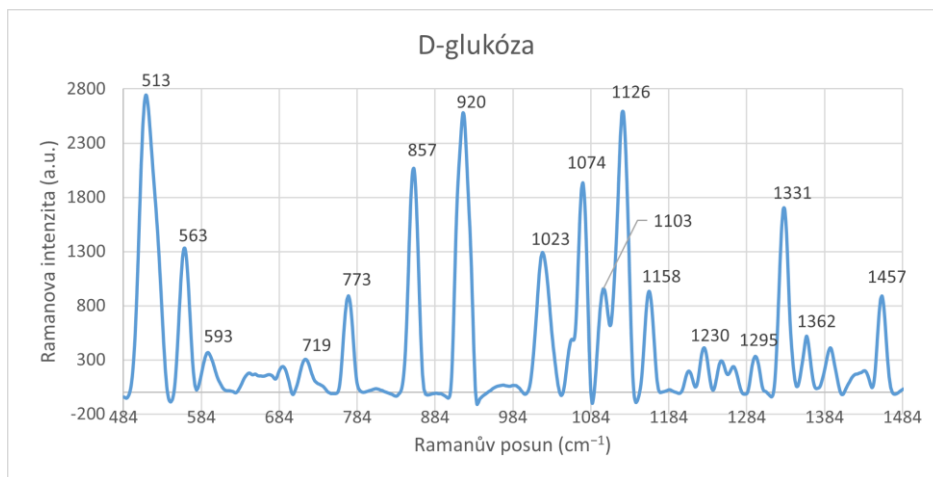
Byly naměřeny i další pásy vazeb C-O při 1051 a 1177 cm^{-1} , vazeb CH_2 při $1267, 1347$ a 1471 cm^{-1} a vazeb COH při 1142 cm^{-1} , které odpovídají údajům z publikace Yao et al., (2020).



Obrázek 31 Ramanovo spektrum D-fruktózy

(Zdroj: vlastní)

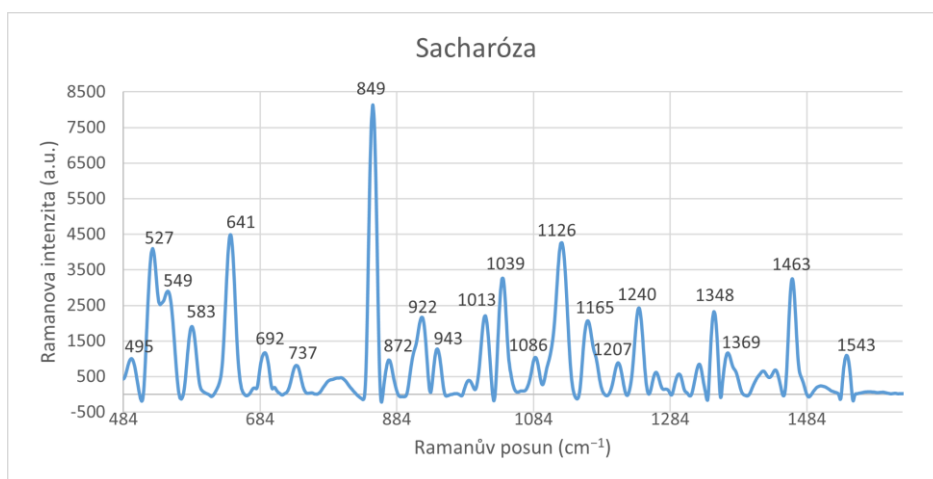
D-glukóza vykazovala v Ramanově spektru (obrázek 32) silné pásy $513, 857, 920\text{ cm}^{-1}$ v důsledku vibrací vazeb C-C, C-O, C-C-C, C-C-O a O-C-O a pásy $1074, 1126, 1331\text{ cm}^{-1}$ související s vibrací vazeb skupin OH. Střední pásy 563 cm^{-1} lze přiřadit k vibraci skeletu a pás 1023 cm^{-1} k vibraci skupin OH. Slabý pík 773 cm^{-1} byl přiřazen vazbám C-C a C-O, píky $1103, 1158$ a 1457 cm^{-1} odpovídají vibracím OH skupin. Další velmi slabé pásy 593 a 719 cm^{-1} byly přiřazeny vibracím skeletu molekuly a píky $1230, 1295$ a 1362 cm^{-1} vibracím skupin OH navázaných na skelet. Naměřené hodnoty jsou v souladu s publikacemi (Golparvar et al., 2021; Zheng et al., 2023).



Obrázek 32 Ramanovo spektrum D-glukózy

(Zdroj: vlastní)

Ramanovo spektrum **sacharózy** (obrázek 33) obsahovalo jeden hlavní silný pás 849 cm^{-1} způsobený vibracemi C-O-C a C-C vazeb. Střední pík 527 cm^{-1} souvisejí s vibrací vazby C-C-O, pík 641 cm^{-1} odpovídající vibraci vazeb C-C a slabý pík 1039 cm^{-1} lze přiřadit vibracím C-C i C-H vazeb. Tyto posuny se shodují s údaji uvedenými v literatuře (Guven et al., 2019; Mignani et al., 2014). Další slabé píky byly přiřazeny takto: vibrace vazeb O-C-O při 549 cm^{-1} , O-C-C při 872 cm^{-1} , C-C při 922 cm^{-1} , CH_2 při 1348 a 1463 cm^{-1} , C-O při 1013 cm^{-1} , OH při 1165 a 1240 cm^{-1} , deformace glukofuranového kruhu při 641 cm^{-1} a vibrace vazby C-O při 1126 cm^{-1} . Polohy píků jsou ve shodě s údaji autorů Brizuela et al. (2012).



Obrázek 33 Ramanovo spektrum sacharózy

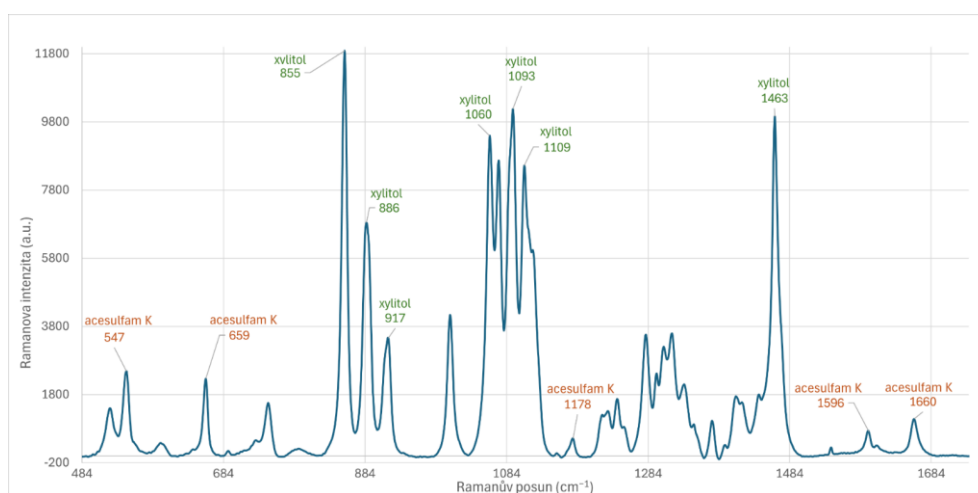
(Zdroj: vlastní)

7.2 Ramanova spektra sypkých směsí sladidel

V praxi se někdy využívá kombinace dvou nebo více nízkokalorických sladidel, případně kombinace sladidel a cukru, pro dosažení optimální chuti výrobku. V předchozí kapitole byla zobrazena Ramanova spektra vybraných sladidel s popisem charakteristických píků a jejich intenzit a s použitím literatury byly k píkům přiřazeny odpovídající vibrace vazeb. Při porovnání spekter je zřejmé, že díky jejich odlišnostem nebo alespoň dílčím rozdílům je možné detekovat sladidla i ve směsi s jinými sladidly a látkami.

Z toho důvodu byly proměřeny směsi dvou a tří kombinací sladidel s cílem identifikace charakteristických a dostatečně silných píků použitých sladidel ve směsi. Popis přípravy těchto směsí je uveden v kap. 6.6.

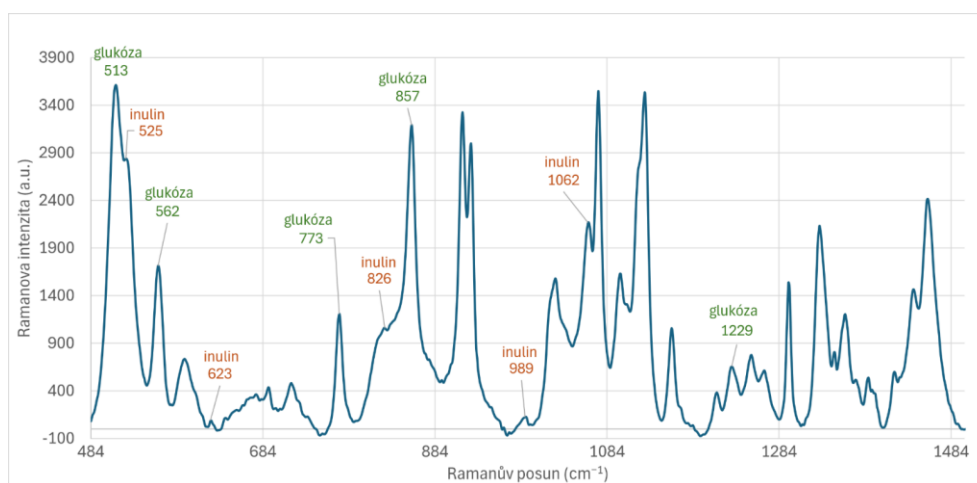
Ramanovo spektrum práškové směsi sladidel xylitolu a acesulfamu K v poměru 1:0,1 je uvedeno na obrázku 34. Obě sladidla jsou charakterizována dobře odlišenými píky, které se navzájem nepřekrývají, viz příloha P I. Pro snadnější orientaci ve spektru směsi jsou důležité píky označeny jinou barvou pro každé ze sladidel. Kromě charakteristické polohy píků je současně zřetelný rozdíl také v intenzitách píků, které korespondují s poměrem sladidel ve směsi, kdy píky xylitolu (855 , 1093 , 1463 cm^{-1} a další) vykazují cca 10x vyšší intenzitu než píky odpovídající acesulfamu K (547 , 659 , 1178 cm^{-1} a další).



Obrázek 34 Ramanovo spektrum směsi xylitolu s acesulfamem K (v poměru 1:0,1)

(Zdroj: vlastní)

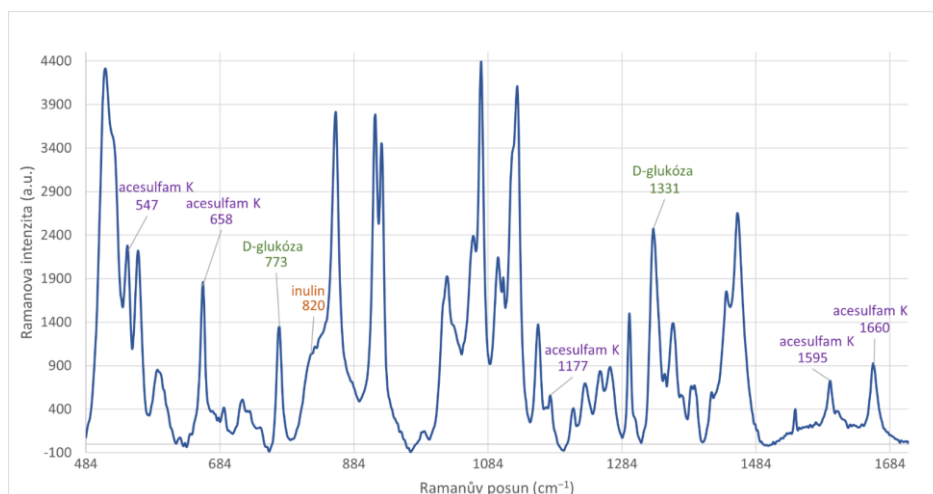
Další proměřovanou sypkou směsí byla směs inulinu s D-glukózou v poměru 1:1, jejíž Ramanovo spektrum je uvedeno na obrázku 35. Silné a střední píky byly přiřazeny inulinu a glukóze a pro přehlednost byly ve spektru barevně vyznačeny. Toto přiřazení píků bylo provedeno dle rozdílů ve spektrech samostatných sladidel, viz příloha P II. Přestože spektrum směsi obsahuje výrazné píky, při některých vlnočtech došlo k překryvu pásů a také k posunu píků. Například v oblasti vlnočtu 525 cm^{-1} je pás inulinu částečně překrýván D-glukózou a projevil se v podobě ramene vycházející z pásu D-glukózy 513 cm^{-1} . Další překrytí je vidět v oblasti vlnočtu 826 cm^{-1} . Relativně silný a široký pás přiřazený inulinu se překrývá se silným píkem 857 cm^{-1} D-glukózy.



Obrázek 35 Ramanovo spektrum směsi inulinu s D-glukózou (v poměru 1:1)

(Zdroj: vlastní)

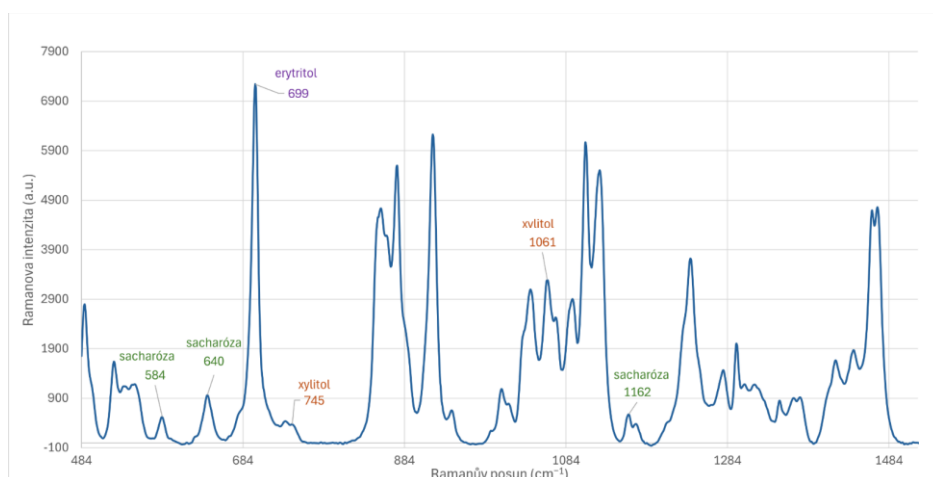
Následně byla proměřena směs všech tří složek inulinu, D-glukózy a acesulfamu K dohromady v poměru 1:1:0,1. Výsledné Ramanovo spektrum je uvedeno na Obrázku 36. Toto Ramanovo spektrum obsahuje mnohem více pásů společných pro dvě a více sladidel. Takové píky nejsou specifické a není podle nich možné dílčí sladidla ve směsi rozlišit. Porovnáním spekter sladidel (viz příloha P III) byly vybrány píky odpovídající jen jednotlivým složkám a byly odlišeny barevně. Píky charakteristické pro acesulfam K ($547, 658, 1177, 1595$ a 1660 cm^{-1}) mají ve směsi nižší intenzitu, což odpovídá nízkému zastoupení acesulfamu ve směsi, ale i přesto jsou dobře odlišitelné od významných píků dalších dvou látek. Pro inulin je možné v takové směsi odečíst pouze pík v oblasti vlnočtu 820 cm^{-1} , kdy je pík částečně překryt signálem D-glukózy i acesulfamu K. Ramanův signál odpovídající D-glukóze se ve spektru projevil několika samostatnými píky. V obrázku jsou označeny dva z důvodu jejich dobré čitelnosti, a to pásy 773 a 1331 cm^{-1} . Tyto barevně vyznačené pásy by bylo možné použít pro detekci jednotlivých sladidel ve směsi.



Obrázek 36 Ramanovo spektrum směsi inulinu s D-glukózou a acesulfamem K (v poměru 1:1:0,1)

(Zdroj: vlastní)

Obdobná je situace ve směsi xylitolu s erytritolem a sacharózou v poměru 1:1:1 (obrázek 37), kde bylo s ohledem na výraznou podobnost struktury těchto látek a tomu odpovídajícímu překryvu Ramanových pásů možné pro případnou detekci složek použít pouze některé pásy. Porovnání čistých spekter sladidel a spektra jejich směsi je uvedeno v příloze P IV. Pro erytritol zůstal jediný charakteristický pás při vlnočtu 699 cm^{-1} , xylitolu byly přiřazeny pásy 745 a 1061 cm^{-1} a sacharóze se dalo přiřadit několik slabých píků (584 , 640 a 1162 cm^{-1}).



Obrázek 37 Ramanovo spektrum xylitolu s erytritolem a sacharózou (v poměru 1:1:1)

(Zdroj: vlastní)

Z Ramanových spekter směsí sladidel je možné rozpoznat, která sladidla byla ve směsi obsažena pomocí jejich charakteristických píků, avšak s vyšším zastoupením látek ve směsi se mohou píky navzájem překrývat. Typické vazby stanovovaného sladidla mohou být obsaženy také ve strukturách ostatních látek přítomných ve směsi. Nejpresnější rozlišení píků sladidel od ostatních látek lze stanovit tehdy, když charakteristický pík sladidla není překryt nebo jinak ovlivněn okolními posuny ve spektru. Například ve studii Ilaşlan et al. (2015) byly pro stanovení glukózy v nealkoholických nápojích použity píky při vlnočtech 517, 849, 913 a 1124 cm^{-1} , kdy pásy 517 a 849 cm^{-1} mohou odpovídat pásům D-glukózy při vlnočtech 513 a 857 cm^{-1} ve směsi s inulinem (obrázek 35). Sacharóza měla ve směsi s mlékem (Nieuwoudt et al., 2016) charakteristické píky při vlnočtech 636, 836 a 1062 cm^{-1} , kdy pík 636 cm^{-1} odpovídal naměřenému píku 640 cm^{-1} pro sacharózu ve směsi s xylitolem a erytritolem (obrázek 37). V literatuře existuje jen málo odborných studií o detekci více než jednoho sladidla ve vzorku.

7.3 Ramanova spektra směsí sladidel se zvyšující se koncentrací

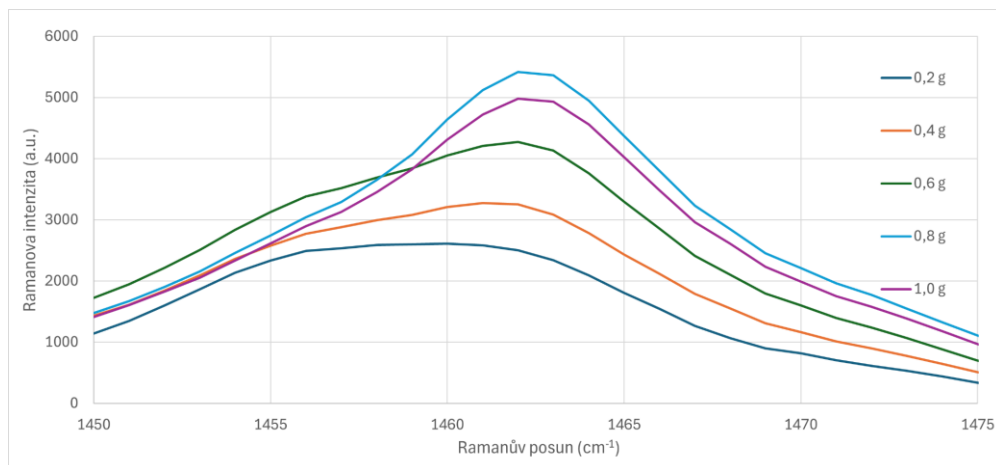
Pro kvantitativní stanovení se také využívají charakteristické píky látek obsažených ve směsi. Koncentraci stanovené látky lze odečíst ze sledování měnicích se intenzit pásu odpovídajícímu vibraci vazby téže látky při různém obsahu a jejím porovnáním s látkou o konstantní koncentraci ve stejné směsi (referenční látkou), jejíž pás by měl mít v ideálním případě stabilní hodnotu Ramanovy intenzity. Vzájemným porovnáním intenzit vybraných píků je získána tzv. relativní intenzita, která zohledňuje proměnlivost intenzit Ramanových spekter z důvodu kolísání síly laseru, geometrie měření apod. Výsledkem závislosti relativní intenzity na koncentraci stanovené látky je přímka, která udává, do jaké míry je tato závislost lineární, což může být vyjádřeno jakožto koeficient determinace. Dobrá lineární závislost ukazuje vhodnost vybraných píků pro kvantitativní stanovení dané látky v této směsi a umožňuje zautomatizování měření používané zejména v přenosných Ramanových spektrometrech.

Ramanova spektra směsí sladidel byla proměřena za účelem kvantitativního stanovení jedné ze složek ve vzorku. Popis těchto směsí je uveden v kap. 6.6.

Pro kvantitativní stanovení xylitolu ve směsi s D-glukózou, jakožto stabilní referenční složkou směsi, byly vybrány charakteristické píky pro obě sladidla. Pro kvantitativní stanovení xylitolu byly vybrány pásy při 747, 1060, 1094 a 1463 cm^{-1} . Dále byly vybrány pásy pro D-glukózu s co nejstabilnější hodnotou intenzity. Nejlepší závislost relativní intenzity byla získána pro píky při vlnočtech 1463 cm^{-1} pro xylitol (obrázek 38) a 690 cm^{-1} pro D-glukózu. Závislost relativní intenzity na koncentraci xylitolu u těchto píků (obrázek 39) vyšla nejvíce lineárně s koeficientem determinace 0,9844. V tabulce 2 jsou uvedeny koeficienty determinace vypočítané pro různé relativní intenzity xylitolu a D-glukózy.

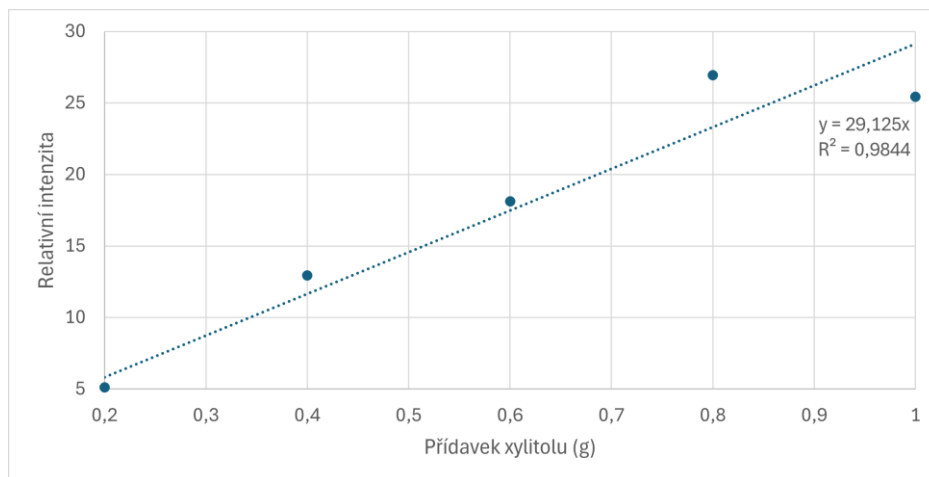
Podle literatury (De Veij et al., 2009; Novotná et al., 2011; Zhang et al., 2023) vybrané píky xylitolu odpovídají vibračním vazeb: při 747 cm^{-1} OH, při 1060 a 1094 cm^{-1} CO a při 1463 cm^{-1} CH₂.

Použití těchto charakteristických vlnočtů pro zjištění množství stanovené látky ve vzorku bylo publikováno v některých odborných studiích. Například ve studii Golparvar et al. (2021) pro stanovení koncentrace glukózy v krvi byl použit pík při vlnočtu 1125 cm^{-1} , který byl dostatečně citlivý na změnu koncentrace glukózy již při nízkých koncentracích.



Obrázek 38 Ramanův pás xylitolu při vlnočtu 1463 cm^{-1}

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 39 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci xylitolu ve směsi s D-glukózou při vlnótech (1463/690)

(Zdroj: vlastní)

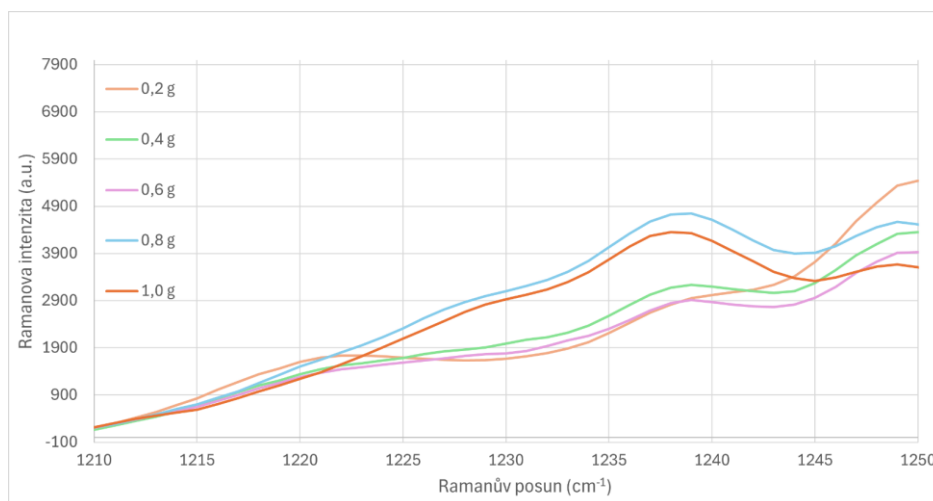
Tabulka 2 Koeficienty determinace z měření koncentrace xylitolu ve směsi

I (xylitol/D-glukóza)	R ²
747/773	0,8343
1094/1160	0,9718
1060/719	0,9821
1463/690	0,9844

(Zdroj: vlastní)

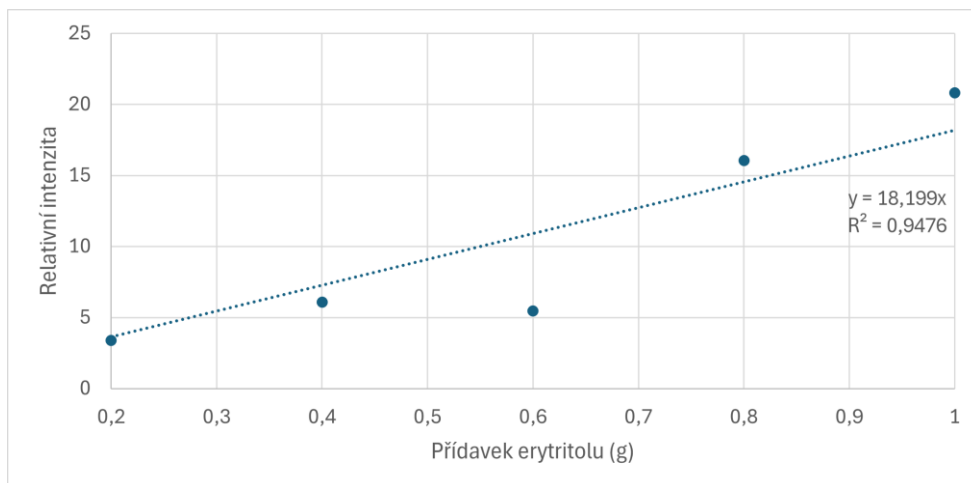
Byly proměřeny směsi s konstantním obsahem fruktózy a s rostoucí koncentrací erytritolu. Pro kvantitativní stanovení erytritolu byly vybrány tři pásy při 488, 1108 a 1239 cm^{-1} . Jako referenční píky D-fruktózy byly použity vlnočty 750, 1295 a 1392 cm^{-1} . Nejvhodnější píky byly 1239 cm^{-1} pro erytritol (obrázek 40) a 1392 cm^{-1} pro D-fruktózu. Závislost relativní intenzity na rostoucí koncentraci erytritolu má lineární charakter s koeficientem determinace 0,9476 (obrázek 41). V tabulce 3 jsou uvedeny koeficienty determinace získané při porovnání dalších relativních intenzit píků erytritolu a D-fruktózy.

Porovnáním s literaturou (Novotná et al., 2011) tyto píky erytritolu odpovídají vibračním vazeb CC při vlnótech 488 a 1108 cm^{-1} a vazeb C-OH při vlnótu 1239 cm^{-1} . Mignani et al. (2014) použili pro detekci a kvantifikaci erytritolu ve stolních sladidlech píky při vlnótech 700, 867 a 1046 cm^{-1} . Pro zpracování naměřených dat byla použita metoda PCA (Principal Component Analysis).



Obrázek 40 Ramanův pás erytritolu při vlnótu 1239 cm^{-1}

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 41 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci erytritolu ve směsi s D-fruktózou při vlnočtech (1239/1392)

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 3 Koeficient determinace z měření koncentrace erytritolu ve směsi

I (erytritol/D-fruktóza)	R ²
488/750	0,9416
1108/1295	0,9285
1239/1392	0,9476

(Zdroj: vlastní)

7.4 Ramanova spektra sladidel v roztoku

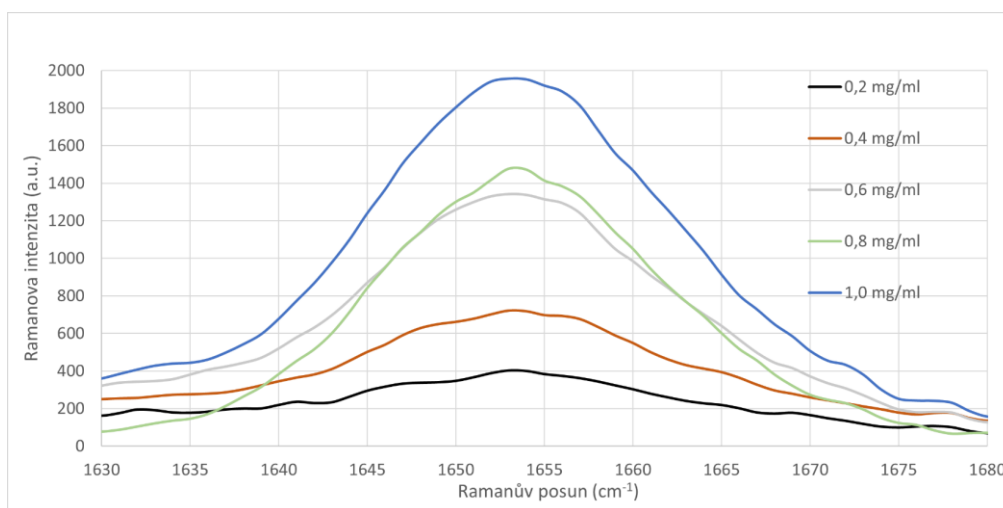
Ze získaných spekter sladidel v roztoku nebylo možné identifikovat jednotlivé pásy, ani vyhodnotit jejich intenzitu, z důvodů vysoké fluorescence vzorku a vysokého šumu pozadí, které přehlušilo relativně slabý Ramanův signál analytu. Spektra sladidel v roztoku jsou vyobrazena v příloze P V. Získávání dobře čitelných Ramanových spekter měřením vodných roztoků často komplikuje nízká koncentrace analytu, která se ve spektru projeví málo výraznými píky. Pro zakoncentrování roztoku a zvýraznění signálu analytu byla z roztoků sladidel o zvyšující se koncentraci acesulfamu K odpařena voda viz kap. 7.5. Je možné také použít metodu vysychání kapky (drop drying method), kdy je malý objem roztoku nanesen na vhodný inertní povrch a takto je ponechán při laboratorní teplotě vyschnout. Dojde tak k zakoncentrování analytu a žádoucím zvýšení poměru signál/šum. Jedná se o poměrně jednoduchý a efektivní postup. Nevýhodou však je možná nehomogenní distribuce analytu ve vyschlém vzorku, který vytváří během postupného vysychání jakési valy, tzv. coffee ring (Kočišová et al., 2024).

7.5 Ramanova spektra odpařených roztoků sladidel o různé koncentraci

Pro kvantitativní stanovení rostoucí koncentrace acesulfamu K v roztoku s konstantním obsahem sacharózy byly měřeny odparky roztoků, jejichž přesné složení je uvedeno v kap. 6.8. Vyhodnocení spekter bylo shodné s postupem z kap. 7.3.

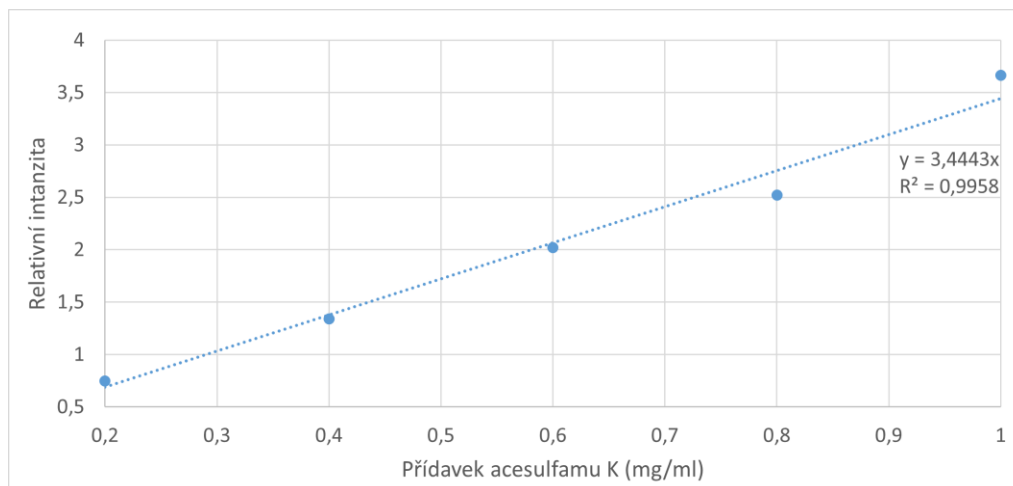
Ze spekter odpařených roztoků byly vybrány oblasti pásů odpovídající měřeným sladidlům. Pro acesulfam K byly hodnoceny píky při vlnótech 546, 653 a 1652 cm^{-1} , pro sacharózu byly zvoleny píky při vlnótech 499, 592 a 691 cm^{-1} . Nejvíce lineární závislost byla získána pro relativní intenzitu při vlnótech 1652 cm^{-1} pro acesulfam K (obrázek 42) a 592 cm^{-1} pro sacharózu. Vzájemným porovnáním intenzit vybraných pásů a jejich vynesení do grafu v závislosti na koncentraci acesulfamu K (obrázek 43) byl získán koeficient determinace 0,9958. V tabulce 4 jsou uvedeny koeficienty determinace pro všechny vyhodnocené relativní intenzity acesulfamu K a sacharózy.

Dle literatury (Güven et al., 2019; Novotná et al., 2011) vybrané píky acesulfamu K odpovídají vibračním vazeb: při 546 cm^{-1} CCO, při 653 cm^{-1} CC a při 1652 cm^{-1} C=C. Silveira Jr. et al. (2009) použili pro kvantifikaci sacharózy pík při vlnótu 1624 cm^{-1} . V jiné studii byly pro stanovení koncentrace sacharózy použity hlavní píky při vlnótech, 525, 547, 638 a 838 cm^{-1} (Mignani et al., 2014) s následným statistickým zpracováním dat pomocí PCA.



Obrázek 42 Ramanův pás acesulfamu K při vlnótu 1652 cm^{-1}

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 43 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci acesulfamu K ve směsi se sacharózou při vlnočtech (1652/592)

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 4 Koeficient determinace z měření acesulfamu K ve směsi

I (acesulfam K/sacharóza)	R ²
653/691	0,7493
1652/592	0,9958
546/499	0,9119

(Zdroj: vlastní)

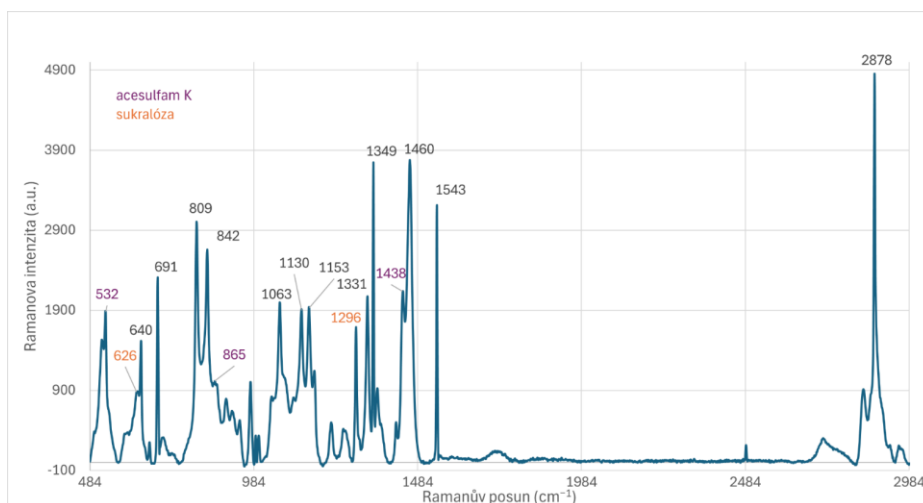
Obdobný způsob stanovení koncentrace sladidel byl publikován i pro další sladidla. Například ve studii autorů Han et al. (2017) byly pro stanovení obsahu sacharinu použity posuny při vlnočtech 707 a 1014 cm⁻¹. V publikaci Armenta et al. (2004) byly koncentrace sacharinu sodného a cyklamátu sodného ve stolních sladidlech vyhodnoceny zpracováním Ramanových spekter pomocí metody PLS (Partial Least Squares Regression).

7.6 Ramanova spektra sladidel v nápojích

Před měřením nápojů přímo v kapalně formě ve skleněných vialkách byly odstraněny bubliny a příp. nerozpuštěný podíl. Ale přesto vykazovala získaná spektra vysokou fluorescenci a slabou intenzitu Ramanova signálu s vysokým podílem šumu. Tato spektra nebyla vhodná pro vyhodnocení (jsou vyobrazena v přílohách P VI a VII). Získávání dobře čitelných spekter nápojů s vysokým podílem vody komplikují faktory jako nízká koncentrace analytu, obsah dalších látek poskytujících fluorescenci apod. (Li et al., 2022). Pro odstranění fluorescence přehlušující spektrum a zvýšení poměru signál/šum byla z nápojů odpařena voda.

Měřením odparků nápojů byla získána čitelná spektra pouze s nízkým šumem. Tato spektra již bylo možné z části odečíst. Nápoje mimo sladidla obsahují i mnoho dalších látek, které se ve spektru také projevují vibracemi vazeb. Pásky píků odpovídající čistým sladidlům mohou být v důsledku obsahu dalších látek posunuty nebo úplně překryty, proto byly vybrány pouze nejméně ovlivněné pásy. Identifikované charakteristické pásy čistých sladidel jsou sepsány v kap. 7.1. Pásky reprezentující sladidla byly barevně odlišeny.

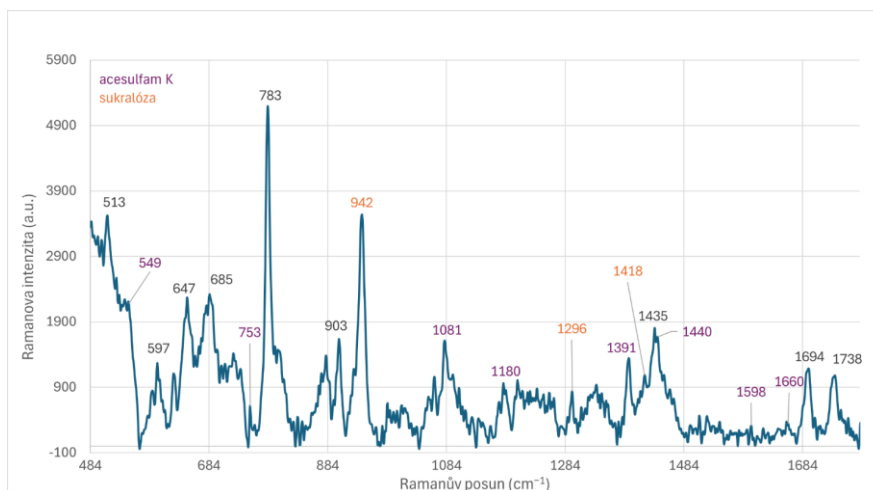
Schweppes INDIAN TONIC obsahoval dle údajů na etiketě jako sladidlo acesulfam K a aspartam. Ve spektru (obrázek 44) se vibrace vazeb acesulfamu K vyskytovaly při vlnočtech 532, 865 a 1438 cm^{-1} . Aspartam měl viditelné vibrace vazeb při vlnočtech 626 a 1296 cm^{-1} .



Obrázek 44 Ramanovo spektrum Schweppes INDIAN TONICU

(Zdroj: vlastní)

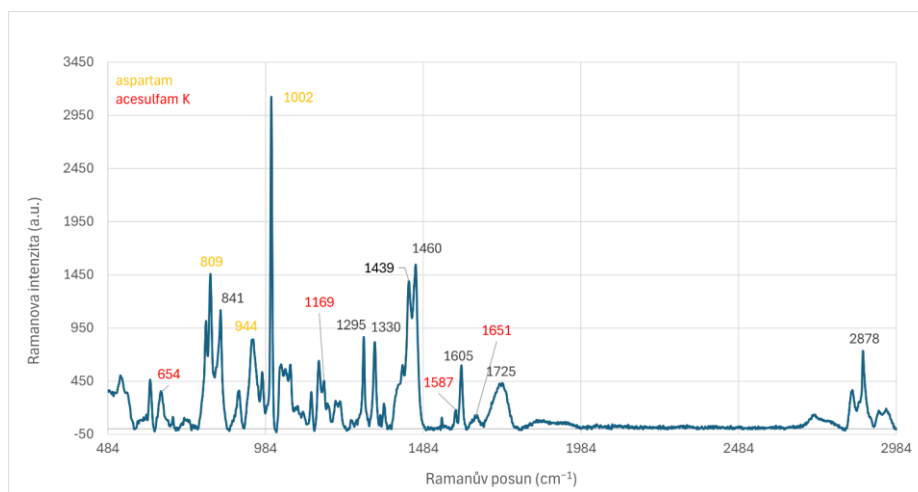
Kinley ZERO TONIC WATER obsahoval sladidla acesulfam K a sukralózu. Ve spektru (obrázek 45) bylo mnoho Ramanových posunů, kdy acesulfamu K odpovídaly pásy při vlnočtech 549, 753, 1081, 1391, 1440, 1598 a 1660 cm^{-1} a sukralóze píky při vlnočtech 942, 1296 a 1418 cm^{-1} .



Obrázek 45 Ramanovo spektrum Kinley Zero TONIC WATER

(Zdroj: vlastní)

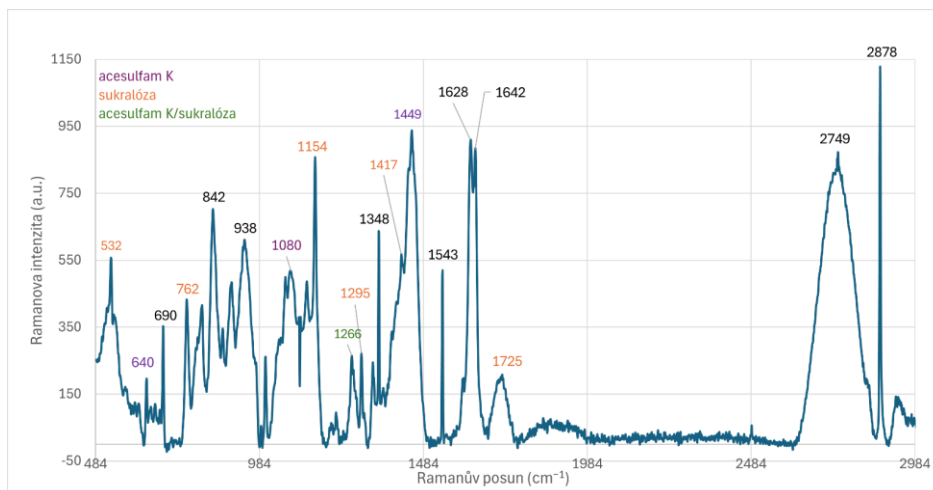
7UP ZERO SUGAR obsahoval aspartam a acesulfam K. Ve spektru (obrázek 46) měl píky odpovídající acesulfamu K při vlnočtech 654, 1169, 1587 a 1651 cm^{-1} a aspartamu při vlnočtech 809, 944 a 1002 cm^{-1} .



Obrázek 46 Ramanovo spektrum 7UP ZERO SUGAR

(Zdroj: vlastní)

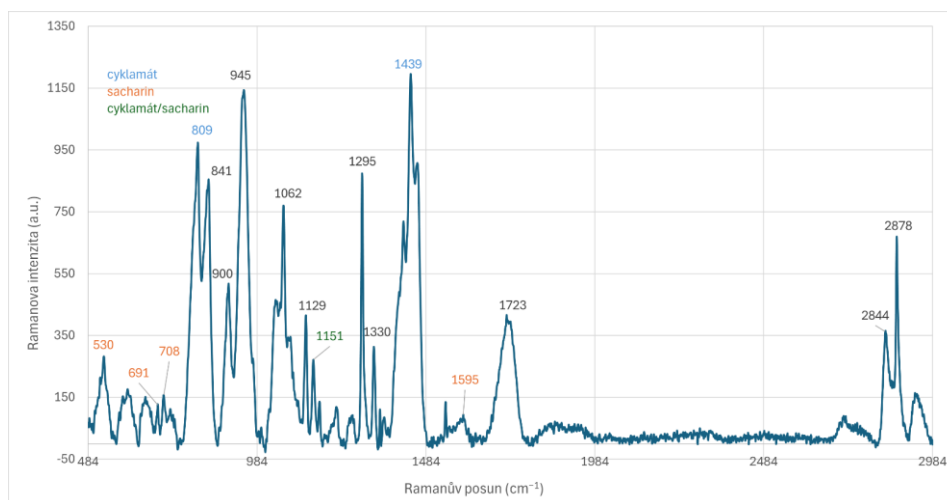
MAGNESIUM CARNITINE ACTIVITY DRINK obsahoval acesulfam K a sukralózu, jejichž některé pásy ve spektru (obrázek 47) se vzájemně překrývaly. Pásky přiřaditelné k acesulfamu K byly při vlnočtech 690, 1080 a 1449 cm^{-1} . Sukralóza byla identifikovatelná při vlnočtech 532, 762, 1154, 1295, 1417 a 1725 cm^{-1} . Společný překrytý pás pro obě sladidla byl viditelný při vlnočtu 1266 cm^{-1} .



Obrázek 47 Ramanovo spektrum MAGNESIUM CARNITINE ACTIVITY DRINK

(Zdroj: vlastní)

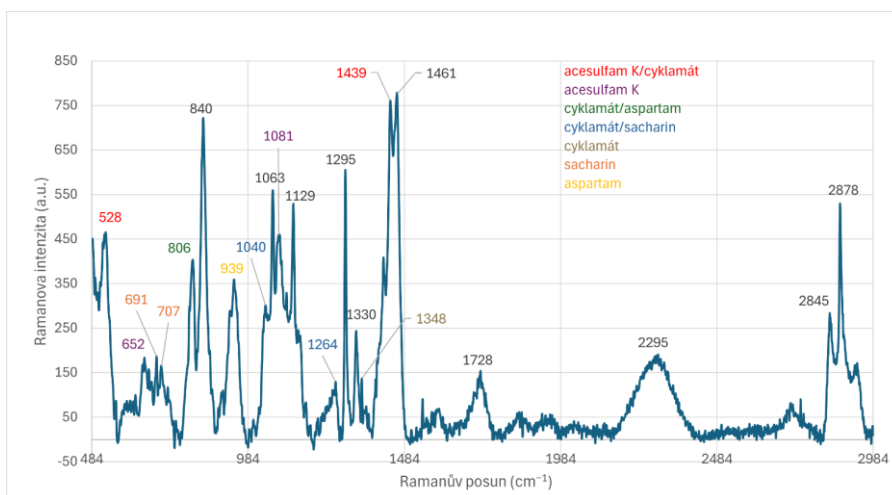
LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO s obsahem cyklamátu a sacharinu měl ve spektru (obrázek 48) přiřazené píky při vlnočtech 809 a 1439 cm^{-1} k cyklamátu, při vlnočtech 530, 691, 708 a 1595 cm^{-1} k sacharinu. Pás při vlnočtu 1151 cm^{-1} odpovídá oběma sladidlům.



Obrázek 48 Ramanovo spektrum LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO

(Zdroj: vlastní)

Aloe Vera ZERO s obsahem čtyř sladidel (cyklamátu, sacharinu, aspartamu a acesulfamu K) vykazoval ve svém spektru mnoho pásů (obrázek 49). Pro acesulfam K byly signály pozorovatelné při vlnočtech 652 a 1081 cm^{-1} . Pás při vlnočtu 1348 cm^{-1} odpovídal cyklamátu. Vibrace vazeb při vlnočtech 528 a 1439 mohou odpovídat acesulfamu K i cyklamátu. U sacharinu byly nejvíce odpovídající píky při vlnočtech 691 a 707 cm^{-1} a společné pásy pro sacharin i cyklamát byly při vlnočtech 1040 a 1264 cm^{-1} . Ramanův posun při vlnočtu 939 cm^{-1} byl charakteristický pro aspartam a při vlnočtu 806 cm^{-1} odpovídá cyklamátu i aspartamu.



Obrázek 49 Ramanovo spektrum Aloe Vera ZERO

(Zdroj: vlastní)

Coca Cola ZERO CUKRU obsahovala cyklamát, acesulfam K a aspartam, ale z důvodu vysoké fluorescence nebylo možné stanovit Ramanovy pásy sladidel (viz příloha P VIII).

Ramanova spektroskopie byla použita v některých studiích pro stanovení sladidel v nápojích. Například v publikaci Silveira Jr. et al. (2009) byla stanovována sacharóza v nealkoholickém citrónovém nápoji s píky pro sacharózu při vlnočtech 824, 911, 1052, 1119, 1255, 1357, 1445 a 1624 cm^{-1} . V jiné studii (Ilaslan et al., 2015) byla v nealkoholických nápojích stanovována glukóza, fruktóza a sacharóza. Hlavní pozorované píky pro fruktózu byly při vlnočtech 627, 707, 870, 819 a 1071 cm^{-1} , pro glukózu pásy při vlnočtech 517, 849, 913 a 1124 cm^{-1} a pro sacharózu posuny při vlnočtech 745 a 796 cm^{-1} . Ve studii Han et al. (2017) byl měřen sacharin sodný v nealkoholických nápojích zesílenou Ramanovou spektroskopií SERS s nejintenzivnějšími pásy při vlnočtech 707 a 1014 cm^{-1} . V naměřených spektrech nápoje LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO byl sacharin zaznamenán na stejné pozici při vlnočtu

708 cm^{-1} (obrázek 48) a u nápoje Aloe Vera ZERO byl sacharin zaznamenán při vlnočtu 707 cm^{-1} (obrázek 49), což je ve shodě s naměřenou studií.

Naměřená spektra s literaturou mnohdy nemusí být totožná ani podobná, protože pásy ve spektru jsou ovlivněny obsahem látek ve zkoumaném vzorku. Čím více složek vzorek obsahuje, tím více se píky spektra překrývají a tím je těžší získat spolehlivou identifikaci jednotlivých složek ve vzorku. Interpretace výsledného spektra je pak velmi složitá a obvykle je nutné použít buď složitější postup pro úpravu vzorku (pro zakoncentrování analytu, nebo odstranění rušivých složek), využít modifikace měření pro zesílení Ramanova signálu (např. SERS), nebo je nutné výsledky zpracovat s použitím pokročilých statistických metod, které umožňují detekovat a kvantifikovat analyty i v případě překrývajících se píků. Nejčastěji jsou v odborných studiích používány již dříve zmíněné metody PCA a PLS (Duarte et al., 2017; Godoy et al., 2014; Mazurek a Szostak, 2011).

8 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na charakterizaci vybraných nízkokalorických sladidel, na měření sladidel Ramanovou spektroskopií, na rozlišení charakteristických Ramanových pásů ve směsi sladidel a detekci přítomnosti sladidel v nápojích.

Teoretická část této práce byla věnována charakteristice sladidel, jejich stanovení pomocí Ramanovy spektroskopie a jiným analytickým metodám pro stanovení sladidel.

V praktické části byla měřením získána Ramanova spektra pro jednotlivá sladidla, ve kterých byly identifikovány charakteristické Ramanovy posuny odpovídající vibraci vazeb jednotlivých sladidel, které byly následně použity pro detekci ve směsích sladidel i v nápojích.

- Byly identifikovány charakteristické píky pro vybraná sladidla z naměřených Ramanových spekter: acesulfamu K (548 a 660 cm^{-1}), aspartamu (802, 8025 cm^{-1} a 1005 cm^{-1}), cyklamátu (805, 1033, 1263 a 1445 cm^{-1}), erytritolu (699 cm^{-1}), inulinu (825 a 1063 cm^{-1}), sacharinu (537 a 709 cm^{-1}), sukralózy (623 a 776 cm^{-1}) a xylitolu (855 a 1463 cm^{-1}).
- Byly identifikovány charakteristické píky také pro D-fruktózu (626, 818 a 872 cm^{-1}), D-glukózu (513, 920 a 1126 cm^{-1}) a sacharózu (849 cm^{-1}).
- Některé z charakteristických píků bylo možné využít pro identifikaci sladidel ve dvou a tří složkových směsích.
- Ve směsi xylitolu s D-glukózou byly hodnoceny vhodné poměry píků pro zjištění relativních intenzit, které nejlépe korespondovaly s rostoucí koncentrací xylitolu ve směsi. Nejvíce lineární závislost byla nalezena pro poměr vlnočtů (1463/690). Pro kvantifikaci množství erytritolu ve směsi s D-fruktózou byla nalezena nejvýraznější korelace relativní intenzity při poměru vlnočtů (1239/1392) a pro acesulfam K ve směsi se sacharózou při poměru vlnočtů (1652/592).
- Čitelná Ramanova spektra nápojů se sladidly byla získána pouze u vzorků po odpaření vodné fáze. V těchto spektrech bylo možné identifikovat několik málo charakteristických píků po srovnání s měřením krystalických forem sladidel.

Výsledky této práce ukázaly, že Ramanova spektroskopie má dobrý aplikační potenciál v oblasti detekce sladidel v krystalické formě i v nápojích. U některých vzorků však došlo k překrytí píků nebo ke snížení intenzity detekovaných pásů, což poukazuje na potřebu optimalizace metodiky měření a vyhodnocování spekter. Ramanova spektroskopie je využívána zejména ve farmacii a technologii obvykle v případech s menším počtem složek v testovaných vzorcích. Na rozdíl od kapalinové chromatografie není normovaná a standardně se při stanovování sladidel v potravinách nepoužívá. Přesto nabízí Ramanova spektroskopie potenciál pro rychlou a přesnou analýzu, využitelnou např. při rutinních kontrolách dozorových orgánů, nebo pro průběžnou kontrolu klíčových kroků ve výrobních technologiích.

Sladidla jsou stále častěji součástí potravinářských receptur, jak z důvodu snížení celkového množství cukru ve výrobku, tak pro vyladění chuti a textury výrobku. Jejich využití se stále rozšiřuje, proto rychlá a přesná analýza usnadní jejich stanovení zvláště pro kontrolní orgány.

Tato práce dokumentuje možnosti pro další studium efektivitu použití spektroskopických metod při analýze potravinářských přídatných látek. Prezentované výsledky korespondují s daty v publikovaných studiích. Variabilitou proměřených vzorků tato práce dále přispívá k literatuře v tom ohledu, že existuje jen málo Ramanových studií o kvantitativní analýze cukrů a sladidel v nealkoholických nápojích a také málo studií poskytujících detekci více než jednoho sladidla v jednom vzorku. Složitost interpretace získaných dat také souvisí s nízkými koncentracemi sladidel v nápojích a obsahem dalších složek, kterých je obvykle v potravinářských výrobcích více.

Pro zvýšení citlivosti a selektivity by bylo vhodné do budoucna využít další varianty metody, například povrchově zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS). Dále by bylo vhodné optimalizovat možnou předpřípravu vzorku a pro zpracování spekter využít pokročilých chromatografických metod.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ARMENTA, Sergio; GARRIGUES, Salvador a DE LA GUARDIA, Miguel, 2004. Sweeteners determination in table top formulations using FT-Raman spectrometry and chemometric analysis. Online. *Analytica Chimica Acta*. Roč. 521, č. 2, s. 149-155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.077>.
- BALAN, C.; CHIS, M.I.; RACHISAN, A.L. a BAJA, M., 2018. A vibrational study of inulin by means of experimental and theoretical methods. Online. *Journal of Molecular Structure*. Roč. 2018, č. 1164, s. 84-88. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.047>.
- BOECKNER, Linda S; SCHNEPF, Marilyn I a TUNGLAND, Bryan C, 2001. Inulin: A review of nutritional and health implications. Online. *Advances in Food and Nutrition Research*. Roč. 2001, č. 43, s. 1-63. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(01\)43002-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(01)43002-6).
- BOESTEN, Daniëlle M. P. H. J.; DEN HARTOG, Gertjan J. M.; DE COCK, Peter; BOSSCHER, Douwina; BONNEMA, Angela et al., 2015. Health effects of erythritol. Online. *Nutra Foods*. Roč. 2015, č. 14, s. 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13749-014-0067-5>.
- BRIZUELA, Alicia Beatriz; BICHARA, Laura Cecilia; ROMANO, Elida; YURQUINA, Alisia; LOCATELLI, Silvano et al., 2012. A complete characterization of the vibrational spectra of sucrose. Online. *Carbohydrate Research*. Roč. 361, č. 1, s. 212-218. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.009>.
- BUYUKGOZ, Guluzar Gorkem; BOZKURT, Akif Goktug; AKGUL, Nese Basaran; TAMER, Ugur a BOYACI, Ismail Hakki. Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy. Online. *European Food Research and Technology*. 2015, roč. 240, č. 3, s. 567-575. ISSN 1438-2377.
- CZARNECKA, Kamila; PILARZ, Aleksandra a ROGUT, Aleksandra, 2021. Aspartame – True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products. Online. *Nutrients*. Roč. 2021, č. 13, s. 6. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13061957>.

ČOPÍKOVÁ, Jana; MORAVCOVÁ, Jitka; WIMMER, Zdeněk; OPLETAL, Lubomír; LAPČÍK, Oldřich et al., 2013. Náhradní sladidla. Online. *Chemické Listy*. Roč. 2013, č. 107, s. 8. Dostupné z: <http://ww-w.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/732/732>.

DE, Sirshendu; MONDAL, Sourav a BENERJEE, Suvrajit, 2013. *Stevioside: Technology, Applications and Health*. Willey-Blackwell. ISBN 978-1-118-35072-0.

DE VEIJ, Marleen; VANDENABEELE, Peter; DE BEER, Thomas; REMON, Jean Paul a MOENS, Luc, 2009. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients. Online. *Journal of Raman Spectroscopy*. Roč. 40, č. 3, s. 235-353. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jrs.2125>.

DUARTE, Lucas M.; PASCHOAL, Diego; IZUMI, Celly M.S.; DOLZAN, Maressa D.; ALVES, Victor R. et al., 2017. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared. Online. *Food Research International*. Roč. 2017, č. 99, s. 106-114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.006>.

FRANTZ, John D., 1998. Raman spectra of potassium carbonate and bicarbonate aqueous fluids at elevated temperatures and pressures: comparison with theoretical simulations. Online. *Chemical Geology*. Roč. 152, č. 3-4, s. 211-225. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(98\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(98)00058-8).

GODOY, José L.; VEGA, Jorge R. a MARCHETTI, Jacinto L., 2014. Relationships between PCA and PLS-regression. Online. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Roč. 2014, č. 130, s. 182-191. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.11.008>.

GOLPARVAR, Ata; BOUKHAYMA, Assim; LOAYZA, Timothy; CAIZZONE, Antonino; ENZ, Christian et al., 2021. Very Selective Detection of Low Physiopathological Glucose Levels by Spontaneous Raman Spectroscopy with Univariate Data Analysis. Online. *BioNanoScience*. Roč. 2021, č. 11, s. 871-877. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s12668-021-00867-w?utm_source=chatgpt.com#Abs1.

GUVEN, Burcu; VELIOGLU, Serap Durakli a BOYACI, Ismail Hakki, 2019. Rapid identification of some sweeteners and sugars by attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy. Online. *GIDA THE JOURNAL OF FOOD*. Roč. 44, č. 2, s. 274-290. ISSN 1300-3070. Dostupné z: <https://doi.org/10.15237>.

HAN, Caiqin; YAO, Yue; WANG, Wen; QU, Lulu; BRADLEY, Layne et al., 2017. Rapid and sensitive detection of sodium saccharin in soft drinks by silver nanorod array SERS substrates. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Roč. 2017, č. 251, s. 272-279. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.051>.

HUTCHINSON, Sheryl A.; HO, Gregory S. a HO, Chi-Tang, 1999. Stability and degradation of the high-intensity sweeteners: aspartame, alitame, and sucralose. Online. *Food Rev. Int.* Roč. 1999, č. 15, s. 12. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/87559129909541189?needAccess=true>.

CHATTOPADHYAY, Sanchari; RAYCHAUDHURI, Utpal a CHAKRABORTY, Runu, 2014. Artificial sweeteners – a review. Online. *Journal of Food Science and Technology*. Roč. 2014, č. 51, s. 10. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-011-0571-1>.

ILASLAN, Kerem; BOYACI, Ismail Hakki a TOPCU, Ali, 2015. Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy. Online. *Food Control*. Roč. 2015, č. 48, s. 56-61. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.001>.

I-Raman Plus Quick Start Guide, 2018. B&W TEK, Inc.

KARUNATHILAKA, Sanjeewa R.; YAKESOVÁ, Betsy Jean; FARRISOVÁ, Samantha; MICHAEL, Tara Jade; HE, Keqin et al., 2017. Quantitation of Saccharin and Cyclamate in Tabletop Formulations by Portable Raman and NIR Spectrometers in Combination with Partial Least Squares Regression. Online. *Food Analytical Methods*. Roč. 2018, č. 11, s. 969-979. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-017-1057-1>.

KOČIŠOVÁ, Eva; KUIŽOVÁ, Alžbeta a PROCHÁZKA, Marek, 2024. Analytical applications of droplet deposition Raman spectroscopy. Online. *Analyst*. Roč. 2024, č. 149, s. 3276–3287. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/d4an00336e>.

LI, Lijiao; CAO, Xiaonian; ZHANG, Ting; WU, Qian; XIANG, Peng et al., 2022. Recent Developments in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Its Application in Food Analysis: Alcoholic Beverages as an Example. Online. *Foods*. Roč. 14, č. 2165, s. 35. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods11142165>.

LUKÁŠ, Luděk, 2013. *Bezpečnostní technologie, systémy a management III*. Zlín: VeRBuM. ISBN 978-80-87500-35-4.

MAZUREK, Sylwester a SZOSTAK, Roman, 2011. Quantification of aspartame in commercial sweeteners by FT-Raman spectroscopy. Online. *Food Chemistry*. Roč. 2011, č. 125, s. 1051-1057. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.075>.

MIGNANI, A.G.; CIACCHERI, Leonardo; MENCAGLIA, Andrea Azelio; THIENPONT, Hugo; VERSCHOOTEN, Tom et al., 2014. Raman Spectroscopy for Distinguishing the Composition of Table-top Artificial Sweeteners. Online. *Procedia Engineering*. Roč. 2014, č. 87, s. 240-243. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.11.634>.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 231/2012 ze dne 9. března 2012, kterým se stanoví specifikace pro potravinářské přídatné látky uvedené v přílohách II a III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, 2012.

NICOLUCI, Ícaro Gouvea; DA SILVA, Beatriz Scardua; BRAGA, Patricia Aparecida de Campos a BRAGOTTO, Adriana Pavesi Ariseto. Simultaneous determination of nine high-intensity sweeteners in liquid and powder tabletop sweeteners. Online. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2023, roč. 40, č. 10, s. 1298-1306. ISSN 1944-0049.

NIELSEN, S. Suzanne, 2017. *Food Analysis*. Online. 5. Springer Cham. ISBN 978-3-319-45776-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>.

NIEUWOUDT, M.K.; HOLROYD, S.E.; MCGOVERIN, C.M.; SIMPSON, M.C. a WILLIAMS, D.E., 2016. Raman spectroscopy as an effective screening method for detecting adulteration of milk with small nitrogen-rich molecules and sucrose. Online. *Journal of Dairy Science*. Roč. 4, č. 99, s. 2520-2536. Dostupné z: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10342>.

NINESS, Kathy R., 1999. Inulin and Oligofructose: What Are They? Online. *The Journal of Nutrition*. Roč. 129, č. 7, s. 1402S-1406S. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316623021053>.

NOVOTNÁ, Radka; ŠILHA, Tomáš a TRÁVNÍČEK, Zdeněk, 2011. Spektrální metody studia chemických látek. Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

O'BRIEN-NABORS, Lyn, 2016. *Alternative Sweeteners*. Online. 4. CRC Press. ISBN 9780429109089. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/b11242>.

O'DONNELL, Kay a KEARSLEY, Malcolm W., 2012. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Online. Wiley-Blackwell. ISBN 9781118373941. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118373941>.

PEICA, Niculina, 2009. Identification and characterisation of the E951 artificial food sweetener by vibrational spectroscopy and theoretical modelling. Online. *Journal of RAMAN SPECTROSCOPY*. Roč. 40, č. 12, s. 2144-2154. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jrs.2384>.

PETERSON, Michael E., 2013. Xylitol. Online. *Témata v medicíně společenských zvířat*. Roč. 28, č. 1, s. 3. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.tcam.2013.03.008>.

ROTH, Klaus a LÜCK, Erich, 2016. The Saccharin Saga – Part 7. Online. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/chemv.201600034>.

SILVEIRA JR., Landulfo; MOREIRA, Leonardo Marmo; CONCEIÇÃO, Viviane G. B.; CASALECHI, Heliodora L.; MUÑOZ, Ingrid S. et al., 2009. Determination of sucrose concentration in lemon-type soft drinks by dispersive Raman spectroscopy. Online. *Journal of Spectroscopy*. Roč. 2009, č. 23, s. 217-226. ISSN 2314-4920. Dostupné z: <https://doi.org/10.3233/SPE-2009-0383>.

SMRČKOVÁ, Štěpánka a BINDZAR, Jan, 2014. Náhradní sladidla jako polutanty vody. Online. *Chemické Listy*. Roč. 2014, č. 108, s. 8. Dostupné z: <http://www.ww-w.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/421/421>.

VARGAS JENTZSCH, Paul; TORRICO-VALLEJOS, Sonia; MENDIETA-BRITO, Sonia; RAMOS, Luis A. a CIOBOTĂ, Valerian. Detection of counterfeit stevia products using a handheld Raman spectrometer. Online. *Vibrational Spectroscopy*. 2016, roč. 83, s. 126-131. ISSN 09242031.

YAO, Xueshuang; FU, Chao; ZHANG, Sinan; LINA, Cheng a JIANG, Zhuo, 2020. Structure investigation of β -D-fructose crystal under high pressure: Raman scattering, IR absorption, and synchrotron X-ray diffraction. Online. *Journal of Molecular Structure*. Roč. 2020, č. 1220, s. 9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128746>.

ZHANG, Shengya; FANG, Wenhui; LI, Fengjiao; ZHAO, Bo a MEN, Zhiwei, 2023. High-pressure-induced phase transition and amorphization of xylitol by Raman spectroscopy. Online. *Journal of Raman Spectroscopy*. Roč. 54, č. 3, s. 233-350. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jrs.6481>.

ZHENG, Zhenhong; YAO, Xueshuang; ZHANG, Sinan; FANG, Leiming a JIANG, Zhuo, 2023. In-situ Raman study of α -D-glucose under different pressure and temperature. Online. *Journal of Molecular Structure*. Roč. 1274, č. 134539, s. 10. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286022021846>.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Vzorec acesulfamu K	14
Obrázek 2 Vzorec aspartamu	16
Obrázek 3 Degradace aspartamu.....	16
Obrázek 4 Vzorec cyklamátu sodného.....	17
Obrázek 5 Vzorec erytritolu.....	19
Obrázek 6 Vzorec sacharinu	20
Obrázek 7 Struktura sukralózy.....	21
Obrázek 8 Vzorec xylitolu	22
Obrázek 9 Vzorec inulinu	23
Obrázek 10 Ramanovo spektrum krystalického aspartamu v oblasti nízkých vlnočtů.....	29
Obrázek 11 Ramanova spektra standardů sacharinu sodného, cyklamátu sodného a monohydrátu glukózy	29
Obrázek 12 Ramanovo spektrum erytritolu a xylitolu.....	30
Obrázek 13 Ramanovo spektrum xylitolu	31
Obrázek 14 Ramanovo spektrum glukózy v roztoku při různých koncentracích	32
Obrázek 15 Vzorčky nápojů	37
Obrázek 16 Ramanův spektrometr i-Raman Plus	38
Obrázek 17 Sonda na měření kapalných vzorků.....	38
Obrázek 18 Sonda přítlačná	39
Obrázek 19 Software BWSpec	39
Obrázek 20 Sladidla v krystalické formě.....	40
Obrázek 21 Skleněné kyvety pro Ramanův spektrometr.....	42
Obrázek 22 Odparky získané po odpaření kapalně fáze nápojů	42
Obrázek 23 Ramanovo spektrum acesulfamu K.....	43
Obrázek 24 Ramanovo spektrum erytritolu	44
Obrázek 25 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem aspartamu, acesulfamu a erytritolu .	45
Obrázek 26 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem sukralózy	46
Obrázek 27 Ramanovo spektrum sladidla se sacharinem	46
Obrázek 28 Ramanovo spektrum sladidla s obsahem cyklamátu	47
Obrázek 29 Ramanovo spektrum inulinu.....	48
Obrázek 30 Ramanovo spektrum xylitolu	48
Obrázek 31 Ramanovo spektrum D-fruktózy	49
Obrázek 32 Ramanovo spektrum D-glukózy.....	50
Obrázek 33 Ramanovo spektrum sacharózy	50

Obrázek 34 Ramanovo spektrum směsi xylitolu s acesulfamem K (v poměru 1:0,1).....	51
Obrázek 35 Ramanovo spektrum směsi inulinu s D-glukózou (v poměru 1:1).....	52
Obrázek 36 Ramanovo spektrum směsi inulinu s D-glukózou a acesulfamem K (v poměru 1:1:0,1).....	53
Obrázek 37 Ramanovo spektrum xylitolu s erytritolem a sacharózou (v poměru 1:1:1)	53
Obrázek 38 Ramanův pás xylitolu při vlně 1463 cm ⁻¹	56
Obrázek 39 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci xylitolu ve směsi s D-glukózou při vlnách (1463/690).....	56
Obrázek 40 Ramanův pás erytritolu při vlně 1239 cm ⁻¹	57
Obrázek 41 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci erytritolu ve směsi s D-fruktózou při vlnách (1239/1392)	58
Obrázek 42 Ramanův pás acesulfamu K při vlně 1652 cm ⁻¹	59
Obrázek 43 Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci acesulfamu K ve směsi se sacharózou při vlnách (1652/592)	60
Obrázek 44 Ramanovo spektrum Schweppes INDIAN TONICU	61
Obrázek 45 Ramanovo spektrum Kinley Zero TONIC WATER.....	62
Obrázek 46 Ramanovo spektrum 7UP ZERO SUGAR.....	62
Obrázek 47 Ramanovo spektrum MAGNESIUM CARNITINE ACTIVITY DRINK	63
Obrázek 48 Ramanovo spektrum LEMON LIME OSHEE VITAMIN WATER ZERO	63
Obrázek 49 Ramanovo spektrum Aloe Vera ZERO.....	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled směsí sladidel a jejich vzájemného poměru.....	41
Tabulka 2 Koeficienty determinace z měření koncentrace xylitolu ve směsi.....	56
Tabulka 3 Koeficient determinace z měření koncentrace erytritolu ve směsi	58
Tabulka 4 Koeficient determinace z měření acesulfamu K ve směsi	60

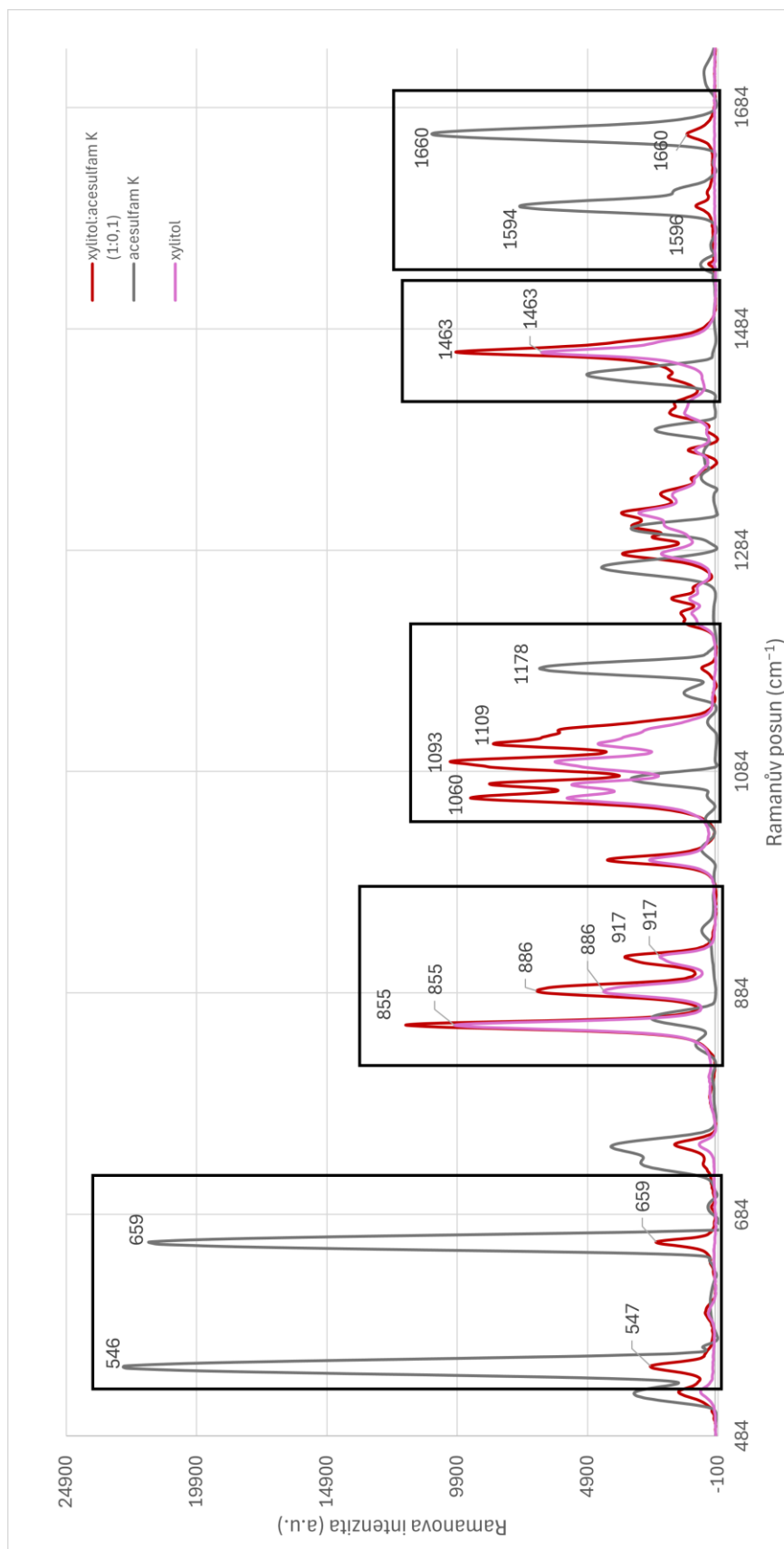
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADI	přijatelný denní příjem (Acceptable Daily Intake)
CCD	zařízení s nábojovou vazbou (Charge-Coupled Device)
ELSD	detekce s pomocí odparu a rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací (Electrospray Ionization Mass Spectrometry)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (Food and Drug Administration)
FT	Fourierova transformace (Fourier Transform)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
PCA	analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PDA	detektor fotodiodového pole (Photodiode Array Detector)
PLS	parciální nejmenší čtverce (Partial Least Squares Regression)
SERS	Ramanova spektroskopie s povrchovým zesílením (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)

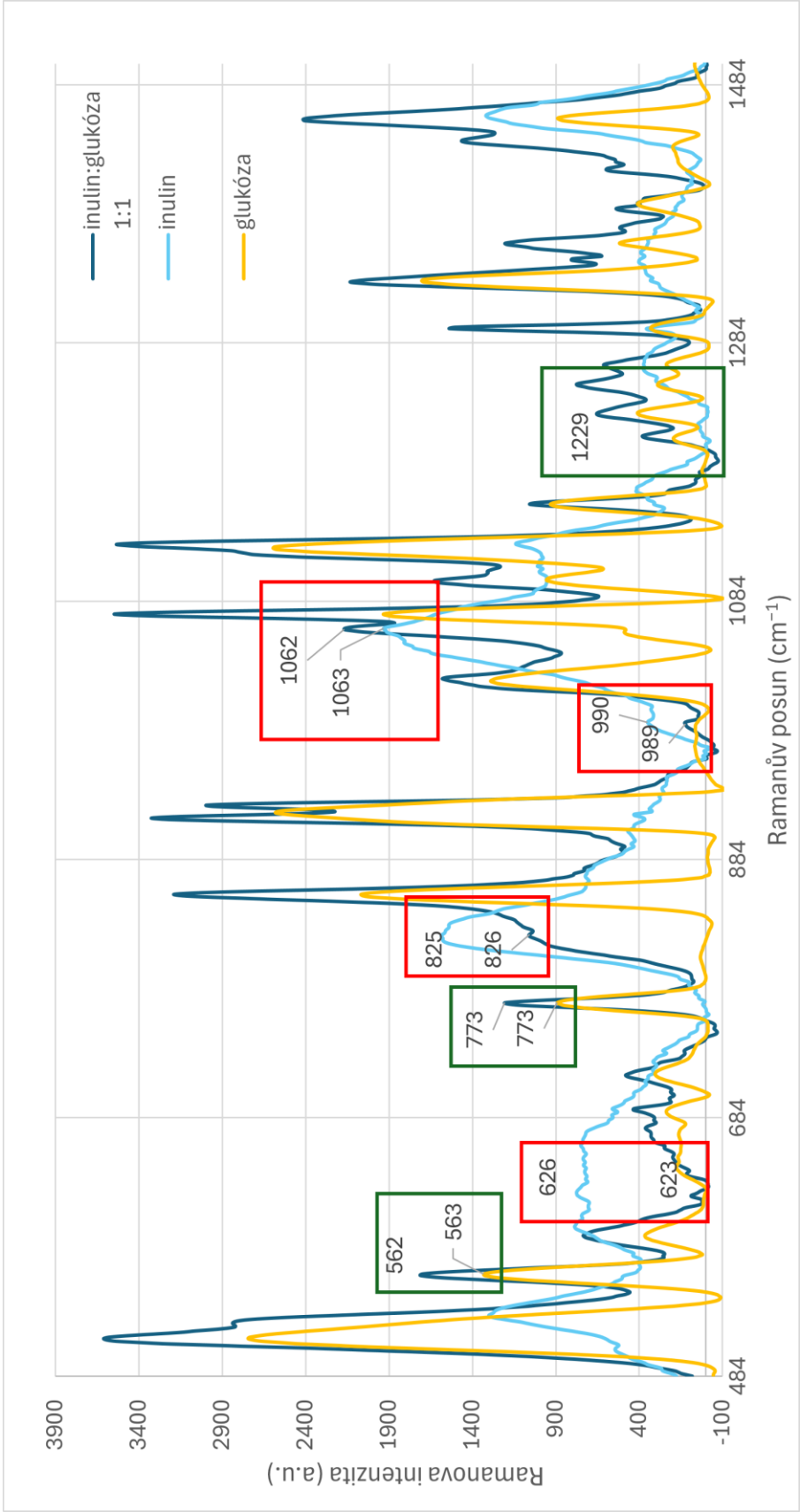
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha P I: Ramanova spektra xylitolu, acesulfamu K a jejich směsi
- Příloha P II: Ramanova spektra inulinu, D-glukózy a jejich směsi
- Příloha P III: Ramanova spektra inulinu, D-glukózy, acesulfamu K a jejich směsi
- Příloha P IV: Ramanova spektra xylitolu, erytritolu, sacharózy a jejich směsi
- Příloha P V: Ramanova spektra roztoků sladidel
- Příloha P VI: Ramanova spektra nápojů
- Příloha P VII: Ramanovo spektrum nápoje Coca Cola ZERO CUKRU
- Příloha P VIII: Ramanovo spektrum odparku nápoje Coca Cola ZERO CUKRU

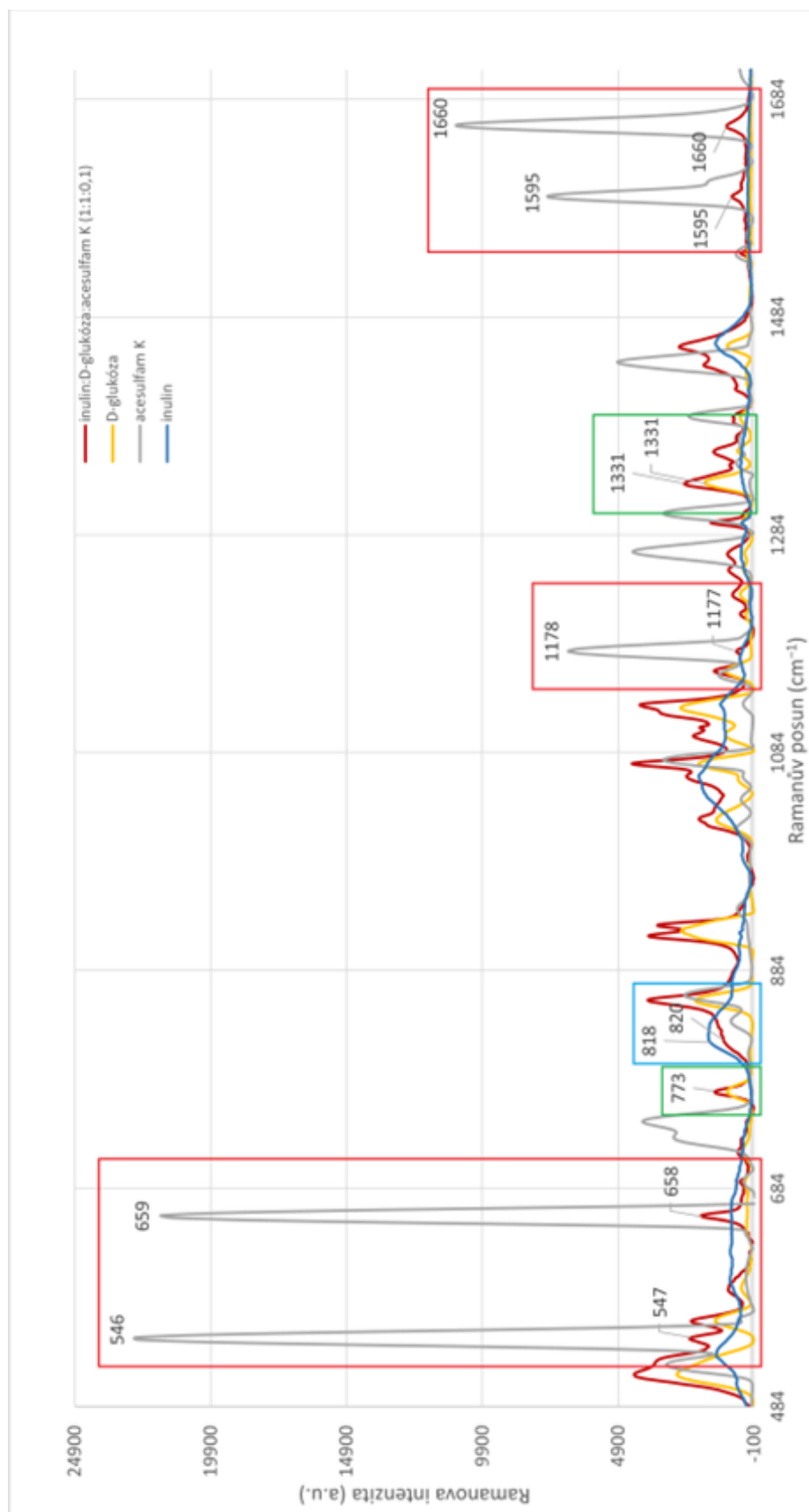
PŘÍLOHA P I: RAMANOVA SPEKTRA XYLITOLU, ACESULFAMU K A JEJICH SMĚSI



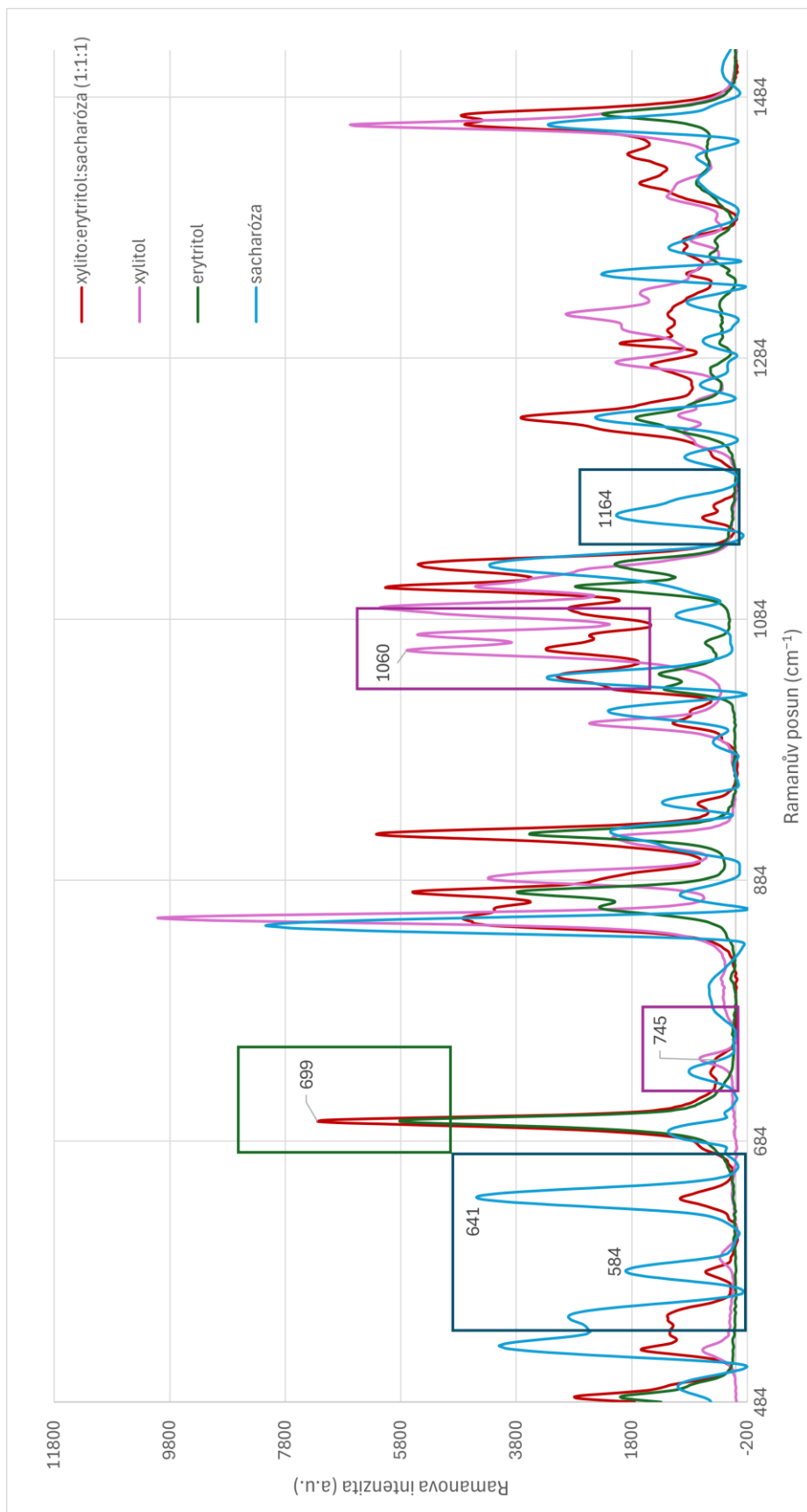
PŘÍLOHA P II: RAMANOVA SPEKTRA INULINU, D-GLUKÓZY A JEJICH SMĚSI



PŘÍLOHA P III: RAMANOVA SPEKTRA INULINU, D-GLUKÓZY, ACESULFAMU K A JEJICH SMĚSI



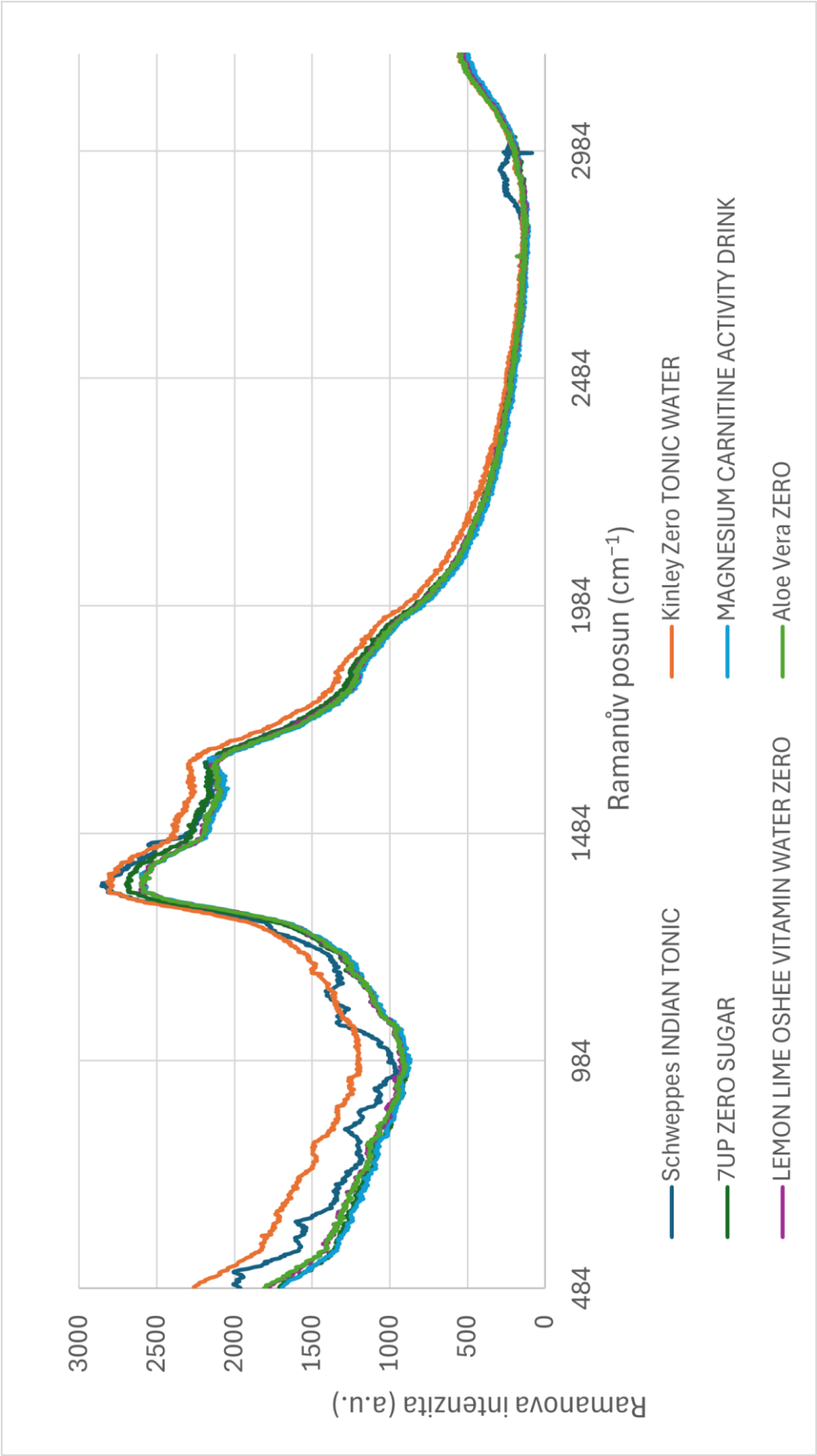
PŘÍLOHA P IV: RAMANOVA SPEKTRA XYLITOLU, ERYTRITOLU, SACHARÓZY A JEJICH SMĚSI



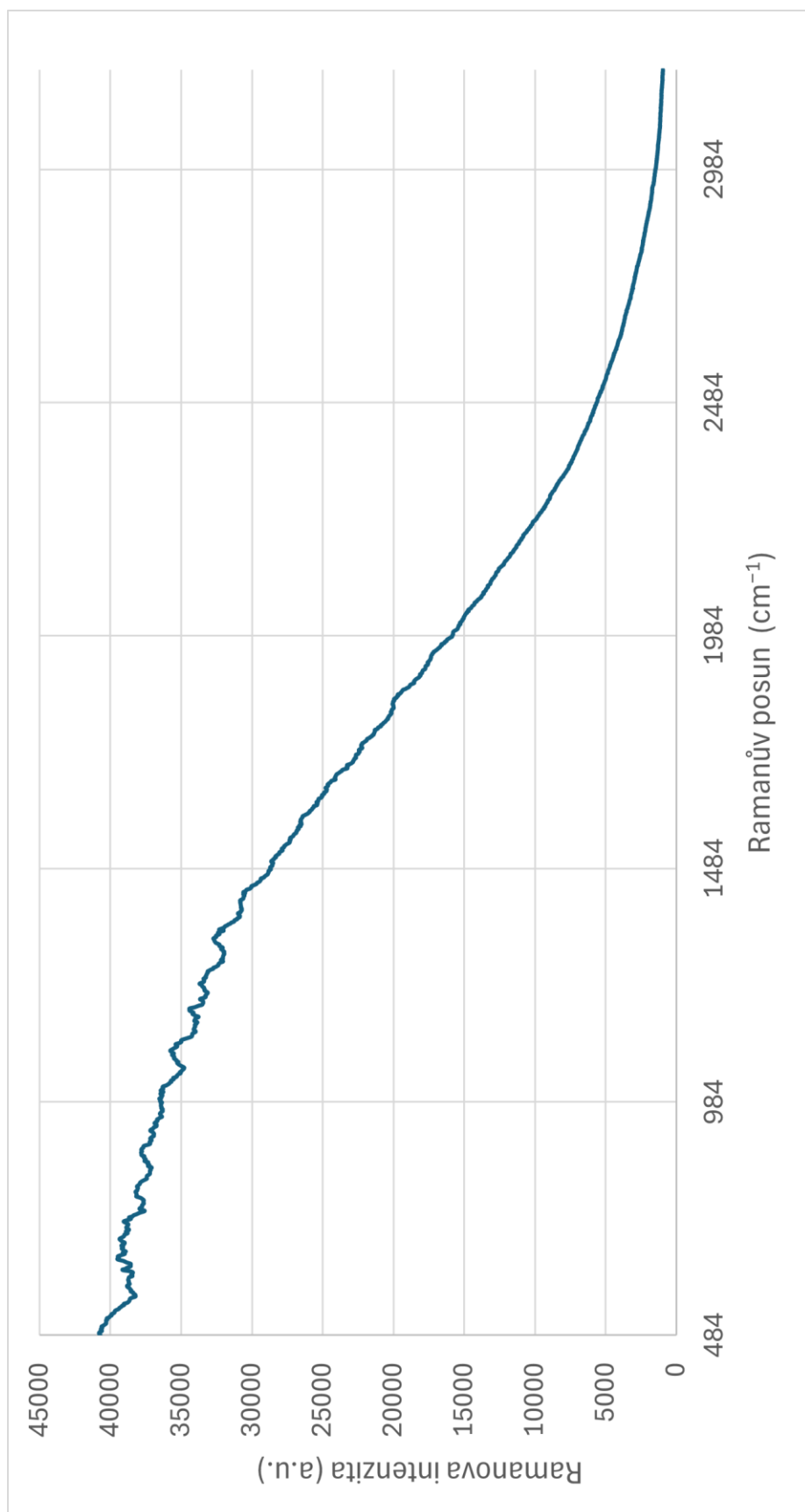
PŘÍLOHA P V: RAMANOVA SPEKTRA ROZTOKŮ SLADIDEL



PŘÍLOHA P VI: RAMANOVO SPEKTRUM NÁPOJŮ



PŘÍLOHA P VII: RAMANOVO SPEKTRUM NÁPOJE COCA COLA ZERO CUKRU



**PŘÍLOHA P VIII: RAMANOVÉ SPEKTRUM ODPARKU NÁPOJE
COCA COLA ZERO CUKRU**

