

# Substancje słodzące – charakterystyka, metabolizm oraz metody oznaczania w środowisku wodnym (cz. II)

*Iwona Krzyżewska, Aleksandra Kozarska*

## Oznaczanie substancji słodzących w środowisku wodnym

W celu ilościowego oznaczenia substancji słodzących na niskich poziomach stężeń, w szerokim zakresie matryc środowiskowych, wymagane jest zastosowanie wiarygodnych technik analitycznych. Ekstrakcję do fazy stałej (SPE) w trybie zarówno off-line, jak i on-line wykorzystuje się do izolacji powyższych związków z próbek wodnych, natomiast jako sorbenty stosuje się najczęściej kopolimery Oasis HLB (lipofilowy diwinylobenzen i hydrofilowy N-winylopirolidon), Isolute ENV+ (hydroksylowany polistyren – diwinylobenzen PS-DVB), HR-X (hydrofobowy PS-DVB), Bakerbond SDB-1 (styren – diwinylobenzen SDVB) i PWAX (polimerowy słaby wymienniacz anionowy). Ponadto opracowano metodę analizy sukralozy z zastosowaniem procesu ekstrakcji i dodatkowego oczyszczania na dwóch rodzajach kartridży Bond Elut PPL (SDVB) i Bond Elut NH<sub>2</sub> (słaby wymienniacz anionowy) [19].

Niektóre badania zakładały eliminację procesu ekstrakcji, a próbki po filtracji były bezpośrednio nasykiwane do

systemu chromatograficznego. Jednakże prowadziło to do zwiększenia limitu detekcji (5 µg/L) [19].

Do oznaczeń substancji słodzących w rozmaitych typach matryc środowiskowych najczęściej używa się chromatografii gazowej, chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz, chromatografii par jonowych. Większość metod opiera się na zastosowaniu kolumn w układzie faz odwróconych, takich jak C<sub>18</sub> czy C<sub>8</sub>, chociaż używane są również inne mechanizmy retencji LC dla omawianych związków polarnych, tj. układy oddziaływań hydrofilowych (HILIC). W technice spektrometrii mas powszechnie stosuje się potrójny kwadrupol (QqQ) z uwagi na uzyskanie większej czułości i specyficzności metody ilościowego oznaczania substancji słodzących. Ponadto spektrometr mas czasu przelotu wykorzystano do analizy aspartamu, sacharyny i sukralozy w próbkach środowiskowych wody i napojów [19].

Opracowano i zwalidowano prostą, wiarygodną oraz czułą metodę analityczną symultanicznego oznaczania ośmiu substancji słodzących – acesulfamu, sacharyny, cykla-

matu, aspartamu, sukralozy, stewiozydów, dihydrochalkonu neohesperydyny, kwasu glicyryzynowego w wodzie rzecznej i ściekach z wykorzystaniem SPE, cieczowej chromatografii z tandemową spektrometrią mas z jonizacją typu elektrosprej (LC-(ESI)MS/MS) [19].

Pobrane próbki ścieków z dopływów i odpływów z dwóch oczyszczalni ścieków oraz wód rzecznych były zakwaszane do pH 3 z użyciem HCl, przechowywane w temperaturze -20°C do czasu analizy. Przed procesem SPE próbki filtrowano z użyciem filtrów z włókna szklanego 1,2 µm z wyjątkiem ścieków pobranych na dopływach do oczyszczalni, które były wstępnie poddawane (przed filtrowaniem) procesowi odwirowywania przy 9000 rpm przez 7 min. Kartridże Oasis HLB (500 mg) były wstępnie kondycjonowane 5 ml metanolu i 5 ml wody ultraczystej. 50 ml ścieków z dopływów na oczyszczalnię, 100 ml ścieków z odpływów oraz 250 ml wody rzecznej podawano na złożę SPE z prędkością przepływu 10-15 ml/min., wcześniej dodając określoną ilość związków deuterowanych. Kolejno kartridże oczyszczano 5 ml mieszaniny

wody:metanol (9:1) i całkowicie suszono pod próżnią. Anality eluowano z sorbentu z użyciem 2,5 mL metanolu i 2,5 mL mieszaniny metanol:woda amoniakalna (NH<sub>4</sub>OH) (95:5). Eluaty odparowano w strumieniu azotu do sucha, a pozostałość rozpuszczano w mieszaninie woda:metanol (9:1) do 2 mL w przypadku wody powierzchniowej i 5 mL dla dopływów i odpływów z oczyszczalni. Przed analizą LC-MS/MS ekstrakty były filtrowane z wykorzystaniem membrany 0,22 µm z materiału hydrofilowego – poli-propylen GHP. W ostatecznym etapie dodawano 6 µl kwasu mrówkowego (HCOOH) [19].

Analizy były prowadzone z wykorzystaniem systemu LC-(ESI)MS/MS sprzężonego ze spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol i jonizacją przez elektrorozpraszanie (ESI). Optymalny rozdział chromatograficzny został osiągnięty na kolumnie Ascentis Express RP (100 mm x 2,1 mm; 2,7 µm). Zastosowano elucję gradientową z wykorzystaniem wody ultraczystej zakwaszonej do pH 2,5 kwasem mrówkowym (rozpuszczalnik A) i acetonitrylu (rozpuszczalnik B) jako fazami ruchomymi. Gradient prowadzono izokratycznie



przez 3 min przy 5% B, następnie wzrastał do 75% w 6 min i do 100% w 1 min, utrzymując się przez 1 min, by ostatecznie powrócić do 5% B w 1 min. Temperaturę pieca kolumny ustalono na 25°C, prędkość przepływu – 0,4 mL/min. Objętość nastrzyku – 50 µL. Wszystkie związki eluowały w czasie mniejszym niż 11 min. i były analizowane w trybie jonizacji negatywnej. Zastosowaną techniką rejestracji jonów było monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (SRM), natomiast napięcie stożka i energia kolizji były optymalizowane w celu wybrania trzech charakterystycznych przejść SRM dla każdego związku. Jeden jon ustalono do oznaczania ilościowego, dwa pozostałe do potwierdzenia. Jednakże tylko dwa przejścia dla sukralozy i cyklamatu były możliwe ze względu na ich słabą fragmentację [19].

Podczas procesu walidacji sprawdzono następujące parametry analityczne: zakres liniowości, powtarzalność, odzwierciedlenie, granicę wykrywalności procedury (metody) analitycznej (MDL), granicę oznaczalności metody (LOQ), odzyski i wpływ matrycy. Metoda była walidowana dla każdego rodzaju matrycy (rzeka, dopływy i odpływy z oczyszczalni) z wykorzystaniem wzorców znakowanych izotopowo w celu skompensowania efektu matrycy i ubytku analitów podczas procesu SPE. We wszystkich przypadkach analizy próbek ślepych (bez dodatku wzorców) były przeprowadzane w celu korekcji powierzchni analitów [19].

Ze względu na hydrofilowość substancji słodzących, polarne grupy funkcyjne wbudowane w łańcuch hydrofobowy w fazie stacjonarnej zwiększały selektywność powyższych związków. Praca na tak niskich poziomach pH pozwalała analitom o charakterze kwasowym, takim jak acesulfam K, sukraloza i cyklammat na zachowanie ich formy protonowanej, co sprzyjało utrzymaniu kształtu piku i retencji w tego typu fazie stacjonarnej [19]. Analiza widma masowego pełnego skanu (jonizacja negatywna) wskazywała na dominujący jon prekursorowy [M-H]<sup>-</sup>, z wyjątkiem sukralozy i stewiozydów, w przypadku których dominującym jonem był ich addukt z Cl<sup>-</sup> [M+Cl<sub>35</sub>]<sup>-</sup> [19].

Substancje słodzące wykazywały zróżnicowaną ścieżkę fragmentacji. Na przykład fragmentacja acesulfamu K prowadziła do otrzymania jonu wtórnego o najwyższej intensywności (m/z 82) generowanego przez ubytek tritlenku siarki (SO<sub>3</sub>). Natomiast dla sacharyny fragmentem o najwyższej intensywności pozostawał jon cyjanianowy [NCO]<sup>-</sup> (m/z 42). W widmie masowym aspartamu jonem o najwyższej intensywności był m/z 200, związany prawdopodobnie z ubytkiem grup metoksykarbonylowych (CH<sub>3</sub>OCO), aminowych (NH<sub>2</sub>) i hydroksylowych (OH) [19]. Fragmentacja jonu molekularnego adduktu sukralozy prowadziła do powstania dwóch jonów m/z 397 (jon najbardziej rozpowszechniony) i 357, przypisywanych strątom odpowiednio jednego atomu chloru (Cl<sub>35</sub>) i dwóch atomów chloru (Cl<sub>35</sub>). Tak jak już wcze-

śniej wspomniano, widmo masowe cyklamatu wskazywało tylko na dwa fragmenty – jon m/z 80 o największej intensywności i jon m/z 96, odpowiadające odpowiednio rodnikowi siarczynowemu [SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> i jonowi amidosulfonianowemu [NH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup> [19].

Ponadto glikozydy takie jak dihydrochalkon neohesperydyny, stewiozydy i kwas glicyryzynowy charakteryzowały się standardową drogą fragmentacji, opartą na utracie części cukru. W przypadku dihydrochalkonu neohesperydyny, jonem o najwyższej intensywności był fragment aglikonu m/z 303, podczas gdy ten sam jon charakteryzował się najwyższą intensywnością wśród jonów wtórnych dla kwasu glicyryzynowego. Utrata monosacharydów z jonu molekularnego stewiozydów prowadziła do otrzymania najintensywniejszego jonu wtórnego m/z 641, odpowiadającego cząsteczce stewiobiozydu [19].

Wyniki badania wpływu matrycy wskazywały na występowanie zjawiska supresji jonów dla analizowanych związków, porównywalnego dla wszystkich trzech badanych matryc. Najbardziej podatne na działanie powyższego niekorzystnego zjawiska były stewiozydy (58-72%) i dihydrochalkon neohesperydyny (70-78%) [19]. Odzyski kształtowały się na poziomie pomiędzy 90% a 104% dla wszystkich matryc z wyjątkiem acesulfamu i cyklamatu, dla których zawierały się w zakresie 69% a 82% [19].

Limity detekcji oznaczono na poziomie 0,001-0,04 µg/L dla wody rzecznej i 0,01-0,5 µg/L

dla ścieków na dopływie i odpływie z oczyszczalni [19].

Kryteria identyfikacji ustalono dla każdego związku, biorąc pod uwagę monitorowanie trzech najpowszechniejszych przejść SRM, ich czasów retencji i względnych intensywności jonów, uzyskanych na podstawie względnych intensywności jonów otrzymanych w analizach próbek wszystkich rodzajów matryc z dodatkiem wzorców [19].

Metoda została wykorzystana do oznaczeń substancji słodzących w wodach rzecznych i ściekach w Katalonii. Cyklammat, aspartam, dihydrochalkon neohesperydyny, acesulfam i sukraloza były obecne w wodzie rzecznej, a dwa ostatnie związki charakteryzowały się największymi wartościami stężeń (1,62 µg/L dla acesulfamu i 3,57 µg/L dla sukralozy). Oznaczono wszystkie związki na poziomie od 0,05 do 155 µg/L w próbkach ścieków z dopływów i odpływów z oczyszczalni ścieków, z wyjątkiem niewykrytych stewiozydów i dihydrochalkonu neohesperydyny [19].

Substancje słodzące mogą być ekstrahowane z osadów ściekowych z zastosowaniem przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (PLE), ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika wspomaganego ultradźwiękami (USE) i ekstrakcji ciecz-ciało stałe. Ponadto istnieje możliwość łączenia powyższych technik z ekstrakcją do fazy stałej (SPE) w celu wstępnego zateżenia i oczyszczenia ekstraktu. Przykładem mogą być badania Subedi i współpracowników, przedstawiające możliwość użycia



PLE w połączeniu z SPE do ekstrakcji sukralozy, aspartamu, sacharyny, acesulfamu i cyklamatu z osadu ściekowego, uzyskując przy tym akceptowalne wartości odzysków. Powyższe wyniki otrzymano przy zastosowaniu mieszaniny metanol:woda (5:3) jako rozpuszczalnika ekstrahującego, przez 30 min. [20].

Najlepszą metodą przeprowadzenia końcowych oznaczeń substancji słodzących zarówno w wodzie, jak i osadzie ściekowym jest cieczowa chromatografia (elektrosprej) sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-(ESI)MS/MS). Bezkonkurencyjne rezultaty otrzymuje się w trybie negatywnej jonizacji ESI. Jednak niektóre badania sygnalizowały otrzymywanie większej ilości fragmentów w trybie jonizacji pozytywnej w przypadku aspartamu, sacharyny i sukralozy [20].

W badaniach prowadzonych przez Arbeláeza i współpracowników [20] opracowano metodę oznaczania najpopularniejszych substancji słodzących acesulfamu, sacharyny, cyklamatu, aspartamu, sukralozy, stewiozydów, dihydrochalkonu neohesperydyny i kwasu glicyryzynowego w osadzie ściekowym. Metodę oparto na selektywnej przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (S-PLE) i SPE, zakończonych LC-MS/MS. Procedurę zwalidowano w celu otrzymywania każdorazowo wiarygodnych i czułych wyników w analizie ilościowej [20].

Próbki odwodnionego osadu pobrano po beztlenowej stabilizacji (fermentacji) osadu

ściekowego, przechowywano w zamrażarce w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do momentu liofilizowania. Po homogenizowaniu próbki z użyciem moździerza i tłuczka, była ona przesiewana przez sito  $125\ \mu\text{m}$  i przechowywana w temperaturze pokojowej [20].

Ekstrakcję substancji słodzących z osadów ściekowych przeprowadzono z wykorzystaniem PLE, a celki ekstrakcyjne ze stali nierdzewnej (pojemność 11 mL) wypełniono od spodu 1 g adsorbentu  $\text{C}_{18}$ , kolejno 1 g wstępnie przygotowanego osadu dokładnie wymieszanego z 2 g  $\text{C}_{18}$ , natomiast trzecią warstwę tworzyła ziemia okrzemkowa w ilości 1 g. Spód oraz górę cel wyściełano filtrami z włókna szklanego. Optymalne warunki prowadzenia PLE ustalono następująco: rozpuszczalnik ekstrakcyjny metanol:woda (1:1), czas podgrzewania 5 min., temperatura ekstrakcji  $40^{\circ}\text{C}$ , ciśnienie ekstrakcji 1500 psi z czasem ekstrakcji statycznej 5 min. w jednym cyklu, objętość rozpuszczalnika do płukania – 40% objętości celki, czas przedmuchu azotem 90 s. Ekstrakt otrzymany z PLE ( $\sim 15\ \text{mL}$ ) odparowano w strumieniu azotu do około 5 ml, a następnie powtórnie uzupełniono wodą do 25 mL. Ekstrakt podawano na kartridże Oasis HLB, wstępnie kondycjonowane 5 ml metanolu, a następnie 5 ml wody ultraczystej. Kartridże były czyszczone 5 ml mieszaniny woda:metanol (9:1) i całkowicie suszone pod próżnią. Związki były eluowane 2,5 ml metanolu, kolejno 2,5 ml roztworem zawierającym 5%

$\text{NH}_4\text{OH}$  w metanolu. Eluat był odparowywany do sucha i powtórnie rozpuszczany w 10 ml mieszaniny metanol:woda (1:9), przed filtracją z wykorzystaniem filtrów membranowych polipropylenowych  $0,22\ \mu\text{m}$  (GHP) i końcową analizą LC-(ESI)MS/MS [20].

System LC-(ESI)MS/MS sprzężony z potrójnym kwadrupolem i jonizacją w trybie ESI został wykorzystany do oznaczenia substancji słodzących w osadzie ściekowym. Parametry i warunki pracy systemu zostały przedstawione we wspomnianych wcześniej badaniach Arbeláeza i współpracowników [19] na temat oznaczania słodzików w wodnych próbkach środowiskowych [20].

Oczyszczanie wewnątrz celi z użyciem sorbentu  $\text{C}_{18}$ , a następnie oczyszczanie ekstraktu S-PLE z wykorzystaniem procesu SPE na kartridżach Oasis HLB, prowadziły do redukcji występowania zjawiska supresji jonów dla niektórych związków. Sygnał LC-MS był tłumiony w zakresie od 13% dla cyklamatu do 69% dla stewiozydów. Dodatkowo sporządzanie roztworów kalibracyjnych na oczyszczonych ekstraktach z próbek niezawierających oznaczanych związków kompensował efekty matrycowe. Odzyski S-PLE/SPE na dwóch poziomach stężeń ( $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$  oraz  $1000\ \mu\text{g}/\text{kg}$  suchej masy) charakteryzowały się wartościami wyższymi niż 61%. Limity detekcji kształtowały się na poziomie  $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$  suchej masy dla wszystkich związków z wyjątkiem cyklamatu ( $5\ \mu\text{g}/\text{kg}$  suchej masy). Metodę zastosowano

do oznaczania substancji słodzących w próbkach osadów ściekowych z trzech oczyszczalni ścieków w Katalonii (Hiszpania). Spośród ośmiu analizowanych związków pięć oznaczono we wszystkich badanych próbkach. Najwyższe stężenie odnotowano dla acesulfamu aż do  $481\ \mu\text{g}/\text{kg}$  suchej masy i sacharyny do  $591\ \mu\text{g}/\text{kg}$  suchej masy [20].

Najpowszechniej stosowanymi metodami analiz substancji słodzących, ze szczególnym uwzględnieniem sukralozy, pozostają chromatografia cieczowa (LC-UV) z detektorem absorpcji w nadfiolecie (UV) czy tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), chromatografia gazowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) lub spektrometrią mas (GC-MS), a także cienkowarstwowa chromatografia (TLC). Wśród tych technik najbardziej polecaną metodą jest LC-MS/MS z uwagi na jej unikalną czułość i selektywność. Ze względu na fakt, iż acesulfam występuje w wodzie w formie zjonizowanej, zastosowanie jonizacji typu elektrosprej przyczynia się do uzyskania wysokiej efektywności, a skan ESI i widmo MS/MS charakteryzują się prostotą i przejrzystym rozkładem izotopowym. W analizach MS/MS acesulfamu osiągnąć można znakomite wartości limitu detekcji na poziomie  $10\ \text{ng}/\text{L}$  z bezpośrednim nastrzykiem  $20\ \mu\text{L}$ . W przeciwieństwie do acesulfamu sukraloza jest związkiem obojętnym i charakteryzuje się skomplikowanym rozkładem izotopowym chloru. Dlatego też analizy LC-MS/MS dla sukralozy nie są



tak czułe jak w przypadku acesulfamu. Czułość LC-MS/MS dla sukralozy wynosi kilka  $\mu\text{g/L}$  w trybie negatywnej jonizacji z zastosowaniem monitorowania wybranych reakcji fragmentacji przy użyciu par jonowych  $m/z$  395-359. Alternatywnie dla uzyskania lepszej czułości stosuje się przejście jonu  $m/z$  395-35 (granica detekcji na poziomie 200  $\text{ng/L}$ ). Jednak  $m/z$  35 w związku z powszechnym występowaniem związków zawierających chlor nie jest wartością specyficzną dla sukralozy. W trybie pozytywnej jonizacji w przypadku analiz sukralozy, addukt sodowy  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  dominuje w skaningu całkowitego widma Q1. Dlatego też addukt sodowy był przyjmowany jako jon prekursorowy w trybie pozytywnej jonizacji MRM, przyczyniając się do osiągnięcia granicy detekcji na poziomie 300  $\text{ng/L}$ . W analizie ESI-MS efekt solny zmniejsza skuteczność jonizacji, dlatego niepożądane jest występowanie jonów  $\text{Na}^+$ . W związku z brakiem stałego stężenia  $\text{Na}^+$  w źródle jonów, addukt sodowy sukralozy nie dostarcza powtarzalnych sygnałów dla oznaczeń ilościowych [21].

Stężenia sukralozy i acesulfamu w systemach wodnych narażonych na wpływ ścieków kształtowały się na poziomie od 0,1 do kilku  $\mu\text{g/L}$ , co wiązało się z koniecznością uzyskania limitów detekcji na poziomie  $\text{ng/L}$ . Czułość metod LC-MS/MS dla analiz sukralozy nie była wystarczająca dla próbek wód bez wstępnego zatężenia. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) była stosowana do zatę-

żenia sukralozy z próbki wody przy współczynniku wzbogacenia 50-1000. Jednakże metody te są czasochłonne, przyczyniając się do wysokich kosztów analizy [21].

Celem badań przeprowadzonych przez Wu i współpracowników [21] było opracowanie czulej, szybszej i niezawodnej metody bezpośredniej analizy sukralozy i acesulfamu bez procesu wstępnego zatężenia. W tym celu badano sukralozę w rozmaitych warunkach prowadzenia procesu UHPLC i MS w celu określenia odpowiednich przejść MRM, zapewniających wysoką czułość i powtarzalny sygnał dla analiz sukralozy. Kolejno zintegrowano nastrzyk o dużej objętości (LVI) z UHPLC-MS/MS [21]. Do separacji substancji słodzących wykorzystano kolumny Dilma C18 (100 mm  $\times$  3 mm  $\times$  3  $\mu\text{m}$ ) i warunki elucji gradientowej (faza ruchoma A – woda zawierająca 0,1% kwasu mrówkowego FA; faza ruchoma B – metanol zawierający 0,1% FA). Gradient prowadzono następująco: 0-2 min, 2-95% B; 2-4 min, 95% B; 4-4,1 min, 95-2% b; 4,1-5 min, 2%, prędkość przepływu 0,6  $\text{ml/min}$ ) [21].

Zastosowano spektrometr mas czasu przelotu (TOF-MS) z bezpośrednim ciągłym dozowaniem próbki ciekłej do źródła jonów w celu uzyskania dokładnych widm masowych dla potwierdzenia obecności acesulfamu i sukralozy. Wykorzystano analizator typu pułapka jonowa w trybie negatywnej jonizacji (MRM). Parametry MRM były wstępnie optymalizowane łącznie z infuzją (prędkość przepływu

10  $\mu\text{l/min}$ ) roztworu sukralozy (500  $\mu\text{g/L}$ ) i acesulfamu (100  $\mu\text{g/L}$ ) rozpuszczonego w 50% metanolu z 0,1% FA. Dobrano optymalne warunki pracy źródła jonów ESI dla LC-MS/MS: gaz osłonowy 40 psi, temperatura źródła jonów 400°C, napięcie źródła jonów -4500 V [21].

Próbki były przechowywane w 4°C, filtrowane w celu usunięcia nierozpuszczalnych cząstek przed analizą UHPLC-MS/MS [21].

Acesulfam jest zjonizowany w roztworach wodnych, będąc prekursorem prostych jonów  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; natomiast w przypadku sukralozy wytwarzanie jonów adduktów ogranicza czułość układu. Addukt kwasu mrówkowego (FA) sukralozy  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  generowany w warunkach LC-MS prowadził do uzyskania dobrej czułości i powtarzalności. W przypadku wykorzystania  $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$  jako jonu prekursorowego w detekcji sukralozy, czułość zwiększyła się około 20 razy w porównaniu do jonu prekursorowego  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . Kolejna modernizacja układu poprzez dodanie nastrzyku o dużej objętości (500  $\mu\text{l}$ ) zredukowała limit detekcji metody do 0,2  $\text{ng/L}$  dla acesulfamu i 5  $\text{ng/L}$  dla sukralozy. Wykorzystano metodę do oznaczania 100 próbek wody studziennej, pobranej w Kanadzie. Acesulfam oznaczono w 24 studniach w stężeniach 1-1534  $\text{ng/L}$  i sukralozę w 8 studniach w stężeniach 65-541  $\text{ng/L}$ . Te wyniki wskazywały, że najbardziej prawdopodobnym źródłem sukralozy i acesulfamu w wodzie studziennej są ścieki, co zakła-

da potrzebę monitorowania jakości domowej wody studziennej [21].

Trzy rodzaje substancji słodzących: acesulfam, sacharynę i cyklamiat oznaczono w odciekach i wodach gruntowych (na jakość których mogły mieć wpływ odcieki) na poziomach porównywalnych do ścieków nieoczyszczonych na 14 spośród 15 badanych składowiskach odpadów komunalnych, włączając w to te zamknięte powyżej 50 lat. Zawartość sacharyny była najwyższa na starych wysypiskach (przed 1990), podczas gdy na nowszych składowiskach dominowały sacharyna i acesulfam. Cyklamiat był również wykrywany, lecz w mniejszej częstotliwości. W większości miejsc stężenia acesulfamu i/lub sacharyny były wyższe od 1  $\mu\text{g/L}$  w co najmniej jednej próbce z każdego miejsca poboru, a maksymalne stężenia wyniosły 85  $\mu\text{g/L}$  dla acesulfamu i 250  $\mu\text{g/L}$  dla sacharyny. Cyklamiat charakteryzował się maksymalnym stężeniem na poziomie 14  $\mu\text{g/L}$  [22].

Większość próbek pobrano z systemu zbierania odcieków i/lub monitorowanych studni, będących własnością lub obsługiwanych przed podmiot zajmujący się składowiskiem. Ponadto pobrano dodatkowo próbki płytkich wód podziemnych (głębokość ~ 0,25-0,75 m) oraz kilka próbek wód powierzchniowych. Analizy wykonywano z użyciem chromatografii jonowej (IC) sprzężonej z tandemową spektrometrią mas typu potrójny kwadrupol, działający w trybie negatywnej jonizacji ESI. Przefiltrowane próbki były



wprowadzane do systemu IC oraz poddawane rozdzielaniu w warunkach elucji gradientowej z wykorzystaniem wodorotlenku potasu od 10 do 75 mM przy prędkości przepływu 0,35 ml/min. Strumień wypływający łączony był z 0,2 ml/min. metanolu z wykorzystaniem pompy izokratycznej, prowadząc do ostatecznego przepływu 0,55 ml/min. Dwa przejścia w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM) wybrano dla każdego analitu i jedno dla każdej substancji wzorca wewnętrznego znaczonego izotopowo. Minimalny limit detekcji został ustalony na poziomie 8 ng/L dla acesulfamu, 21 ng/L dla sacharyny i 3 ng/L dla cyklamatu, a praktyczna granica oznaczania ilościowego kształtowała się na poziomie 20 ng/L dla acesulfamu, 60 ng/L dla sacharyny i 10 ng/L dla cyklamatu [22].

Oznaczano stężenia sztucznej substancji słodzącej sukralozy w wodach przybrzeżnych i otwartych oceanach w Północnej Ameryce z wykorzystaniem wstępnego zatężania z użyciem ekstrakcji do fazy stałej i analizy GC/MS [23]. Wykorzystana w badaniach technika GC/MS wymagała zastosowania kroku derywatywacji przed nastrzykiem próbki do systemu chromatograficznego [24]. Stężenia sukralozy różniły się o ponad dwa rzędy wielkości w zależności od badanych matryc, z największą ilością przypadającą na odpływy z oczyszczalni ścieków (300 nM). Poziomy stężenie zmniejszały się w odbiornikach, a w ujściach rzek kształtowały się na poziomie 0,94 nM. Sukraloza została oznaczona również w wodach oligotroficznym na poziomie od poniżej limitu detekcji do 0,17 nM [23].

### Podsumowanie

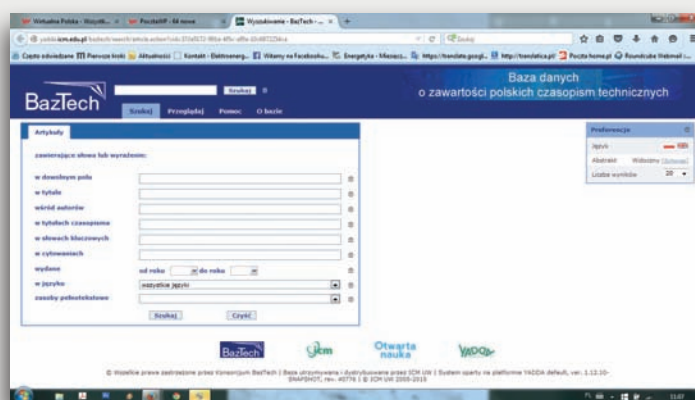
W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zdrowym stylem życia. Cukier zostaje zastępowany innymi substancjami słodzącymi. Substancje te, charakteryzują się bardziej słodkim smakiem w porównaniu do słodczy cukru. Ponadto, substancje słodzące odznaczają się niską kalorycznością, co sprawia, że często dodawane są do produktów spożywczych, medycznych lub kosmetycznych. Do najbardziej popularnych w ostatnich latach substancji słodzących zaliczane są: aspartam, acesulfam, ksylitol, stewia, cyklammat, sukraloza. W badaniach nad metabolizmem substancji słodzących zaobserwowano w niektórych przypadkach tworzenie się bardziej toksycznych pochodnych niż pierwotne formy tych substancji. Dlatego też, stosownym wydaje się, poznanie charakterystyki

oraz szlaków metabolicznych oraz alternatywnych substancji słodzących przed ich spożyciem.

W analizach substancji słodzących wykorzystuje się kilka technik, takich jak cieczowa chromatografia (LC) z detektorami UV lub MS/MS, gazowa chromatografia z detektorami FID czy MS, chromatografia cienkowarstwowa (TLC). Jednak większość metod oznaczania powyższych związków na śladowych poziomach stężeń opiera się na zastosowaniu chromatografii cieczowej w trybie jonizacji elektrosprej z tandemową spektrometrią mas (LC-ESI-MS/MS) ze względu na jej unikalną dokładność i czułość. Próbkę wodną wprowadzane są do systemu chromatograficznego w trybie bezpośrednim, lub po ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W celu wstępnego przygotowania próbek osadów

## BazTech – kopalnia wiedzy

Baza danych o zawartości polskich czasopism technicznych BazTech jest bibliograficzno-abstraktową bazą danych rejestrującą od 1998 r. artykuły z 645 polskich czasopism z zakresu nauk technicznych, ścisłych i ochrony środowiska. BazTech rozwija się w kierunku pełnotekstowej bazy cyfrowej. Do opisów artykułów dodawane są bibliografie załącznikowe (od 2006 r.), a na podstawie odrębnych umów z wydawcami rekordy uzupełniane są o pełne teksty artykułów. Tymi działaniami baza wpisuje się w ruch otwartej nauki.



W bazie zamieszczone są również artykuły z archiwalnych numerów LAB.

Szukaj pod adresem: [yadda.icm.edu.pl/baztech/](http://yadda.icm.edu.pl/baztech/)

ściekowych wykorzystywane są rozmaite metody ekstrakcji, m.in. ekstrakcję w układzie ciecz-ciało stałe, ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami (USE), przyspieszoną ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika (PLE). W badaniach określano wpływ efektu matrycy oraz podejmowano działania w celu zminimalizowania powyższych niekorzystnych oddziaływań, m.in. poprzez zastosowanie wzorców wewnętrznych znaczonych izotopowo.

#### Literatura

- [1] Edwards C.H., Rossi M., Corpe C.P., Butterworth P.J., Ellis P.R. *The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future*. Trends in Food Science & Technology 2016, 56, 158-166.
- [2] Abo Elnaga N.I.E., Massoud M.I., Yousef M.I., Mohamed H.H.A. *Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats*. Annals of Agricultural Science 2016, 61(1), 155-163.
- [3] Świąder K., Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F. *Substancje intensywnie słodzące – korzyści i zagrożenia (tytuł ang. Sweeteners – benefits and risks)*. Probl Hig Epidemiol 2011, 92(3), 392-396.
- [4] Gan Z., Sun H., Wang R., Hu H., Zhang P., Ren X. *Transformation of acesulfame in water under natural sunlight: Joint effect of photolysis and biodegradation*. Water Research 2014, 64, 113-122.
- [5] Zdrojewicz Z., Kocjan O., Idzior A. *Substancje intensywnie słodzące – alternatywa dla cukru w czasach otyłości i cukrzycy*. Med Rodz 2015, 2(18), 89-93.
- [6] Wang M., Qi H., Li J., Xu Y., Zhang H. *Transmembrane transport of steviol glucuronide and its potential interaction with selected drugs and natural compounds*. Food and Chemical Toxicology 2015, 86, 217-224.
- [7] Kolanowski W. *Glikozydy Stewiolowe – Właściwości i Zastosowanie w Żywności*. Bromat. Chem. Toksykol. – XLVI, 2013, 2, 140-150.
- [8] Koyama E., Sakai N., Ohori Y., Kitazawa K., Izawa O., Kakegawa K., Fujino A., Ui M. *Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans*. Food and Chemical Toxicology 2003, 41, 875-883.
- [9] Koszowska A., Dittfeld A., Nowak J., Brończyk-Puzoń A., Gwizdek K., Bucior J., Zubelewicz-Szkodzińska B. *Cukier – czy warto go zastąpić substancjami słodzącymi?* Nowa Medycyna 2014, 1, 36-41.
- [10] Sun J.-P., Han Q., Zhang X.-Q., Ding M.-Y. *Investigations on the degradation of aspartame using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Chinese Chemical Letters 2014, 25, 1259-1264.
- [11] Conceição M.M., Fernandes Jr., V.J., Souza A.G., Nascimento T.G., Aragão C.F.S., Macedo R.O. *Study of thermal degradation of aspartame and its products of conversion in sweetener using isothermal thermogravimetry and HPLC*. Thermochim. Acta 2005, 433, 163-169.
- [12] Gold D.M. *Gorzka prawda o sztucznych słodzikach (tytuł ang. The bitter truth about artificial sweeteners)*. Nexus 1998, 2, 28, 24-30.
- [13] Humphries P., Pretorius E., Naude H. *Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain*. European Journal of Clinical Nutrition 2008, 62, 451-462.
- [14] Li Z., Guo X., Feng X., Li C. *An environment friendly and efficient process for xylitol biocob hydrolysate by adapted Candida tropicalis*. Chemical Engineering Journal 2015, 263, 249-256.
- [15] Lima de Albuquerque T., José da Silva Jr. I., Ribeiro de Macedo G., Valdez Rocha M. *Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review*. Process Biochemistry 2014, 49, 1779-1789.
- [16] Pierini G.D., Llamas N.E., Fragoso W.D., Lemos S.G., Di Nezio M.S., Centurión M.E. *Simultaneous determination of acesulfame-K and aspartame using linear sweep voltammetry and multivariate calibration*. Microchemical Journal 2013, 106, 347-350.
- [17] Li A.J., Schmitz O.J., Stephan S., Lenzen C., Ying-Kit Yue, Li K., Li H., Leung K. S.-Y. *Photocatalytic transformation of acesulfame: Transformation products identification and embryotoxicity study*. Water Research 2016, 89, 68-75.
- [18] Scheurer M., Schmutz B., Happel O., Brauch H.-J., Wülser R., Storck F.R. *Transformation of the artificial sweetener acesulfame by UV light*. Science of the Total Environment 2014, 481, 425-432.
- [19] Arbeláez P., Borrull F., Pocurull E., Marcé R. M. *Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2015, 1393, 106-114.
- [20] Arbeláez P., Borrull F., Marcé R. M., Pocurull E. *Trace-level determination of sweeteners in sewage sludge using selective pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2015, 1408, 15-21.
- [21] Wu M., Qian Y., Boyd J. M., Hrudef S. E., Le X. C., Li X.-F. *Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water*. Journal of Chromatography A 2014, 1359, 156-161.
- [22] Roy J. W., Van Stempvoort D. R., Bickerton G. *Artificial sweeteners as potential tracers of municipal landfill leachate*. Environmental Pollution 2014, 184, 89-93.
- [23] Mead R.N., Morgan J.B., Avery G.B. Jr, Kieber R.J., Kirk A.M., Skrabal S.A., Willey J.D. *Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States*. Mar Chem. 2009, 116, 13-17.
- [24] Gan Z., Sun H., Wang R., Feng B. *A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2013, 1274, 87-96.