

МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АСПАРТАМ ВО ХРАНА

Биљана Петановска – Илиевска, Горан Јанев, Ленче Велкоска-Марковска, Мирјана С. Јанкуловска*

Универзитет Св Кирил и Методиј, Факултет за земјоделски науки и храна,
1000 Скопје, Р. Македонија,
email bpetan88@yahoo.com

Апстракт

Аспартам ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) или метил L- α – аспартил - L - фенилаланинат (IUPAC) е нискокалоричен вештачки засладувач којшто се употребува при производство на храна и пијалаци и некои витамински додатоци без шеќер.

Идеален е како средство за засладување поради малите концентрации коишто се користат за да се постигне посакуваниот ефект, но за жал многубројни се неговите негативни ефекти врз човековото здравје.

И покрај големиот број на студии што укажуваат на штетноста на аспартамот по здравјето на човекот, тој продолжува да се користи. Токму затоа, за заштита на здравјето на потрошувачите од особена важност е контролата на количеството на аспартам во прехранбените производи.

Клучни зборови: аспартам, методи, храна

METHODS FOR DETERMINATION OF ASPARTAME IN FOOD

Biljana Petanovska-Ilievska, Goran Janev, Lence Velkoska - Markovska, Mirjana S. Jankulovska*

Email: bpetanovska@fzh.ukim.edu.mk; bpetan88@yahoo.com

“Ss. Cyril and Methodius” University, Faculty of Agricultural Sciences and food, 1000 Skopje,
Republic of Macedonia

email bpetan88@yahoo.com

Abstract

Aspartame ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) with IUPAC name methyl L- α - aspartyl - L - phenylalaninate is a low-calorie artificial sweetener that is used in food production, beverages and some vitamin supplements without sugar. Aspartame is ideal as a non-sugar sweetener, used in small concentrations in order to achieve the desired effect, but unfortunately there are lots of adverse effects on the human health. Despite the large number of studies that indicate the hazard of aspartame for the human health, it's still used. For these reasons, it is particularly important to control the amount of aspartame in food products in order to achieve consumers health protection.

Key words: aspartame, methods, food

Вовед

Аспартамот е синтетички засладувач, којшто се користи од 1980 година во производството на повеќе од 6000 продукти, вклучувајќи и околу 500 лекови (Soffritti M., и сор.). Поради неговиот висок степен на сладост се користи како замена за сахарозата и останатите шеќери.

Аспартам ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) или метил L- α – аспартил - L - фенилаланинат (IUPAC) е нискокалоричен вештачки засладувач којшто се употребува при производство на

храна и пијалаци, особено безалкохолни пијалаци, мастики за цваќање без шеќер, бомбони и некои витамински додатоци без шеќер. Аспартамот претставува бел прав со сладок вкус, без мирис. Приближно 200 пати е поблаг од сахарозата. Во кисела средина хидролизира до метанол, а при несоодветни услови на чување неговата пептидна врска хидролизира и се добиваат слободни аминокиселини (Ager D. J., и сор.).

Метаболити на аспартам се метанол, фенилаланин и аспарагинската киселина (Сл.1.) (Nantachit K, и сор.), а неговите деградациски производи се 5-бензил-3,6-диоксо-2-пиперазин оцетна киселина (DKP) и β -аспартам, кој исто така може да бидат присутни во засладувачот како нечистотии. Фенилаланин (Phe) е есенцијална аминокиселина која влегува во градбата на протеините, таа не се синтетизира во телото и мора да се внесе преку исхраната. Во организмот може да се конвертира во тирозин, што е уште една протеинска аминокиселина.

Фенилкетонурија (PKU) е наследна болест која предизвикува висока концентрација на фенилаланин и ниско количество на тирозин во крвта. Висока концентрација на фенилаланин во крвта е токсична за мозокот и може, ако не се лекува, да влијае на развојот на мозокот и да предизвика ментална ретардација, нарушувања на расположението и проблеми во однесувањето. Повеќето третмани на PKU имаат цел да го задржат количеството на фенилаланин во крвта на прифатливо ниво, што се постигнува со редуцирана употреба на храна богата со белковини (месо, риба, јајца, млечни производи, ореви и семки), храна со многу скроб, вклучувајќи и храна што содржи брашно (леб, тестенини), како и храна и пијалаци кои содржат аспартам. Во Европската унија, сите производи што содржат аспартам мора да бидат етикетирани како „Содржи извор на фенилаланин“ со цел да се заштитат потрошувачите, кои треба да го избегнат изложувањето на оваа аминокиселина.

Европската агенција за безбедност на храна (EFSA- European Food Safety Authority) на 15 февруар 2013 година закажа јавна расправа со сите засегнати и заинтересирани страни во врска со предлог мислењето за безбедност на аспартам како вештачки засладувач.

Ре-евалуацијата на аспартам е дел од системските ре-евалуации на сите прехранбени адитиви одобрени во ЕУ пред 20 јануари 2009 година. Во мај 2011 година, Европската комисија од EFSA побара предвреме да направи целосна ре-евалуација на безбедноста на аспартамот (E 951), која беше планирано да заврши до 2020 година. Во 2013 година EFSA донесе одлука дека аспартам е безбеден за

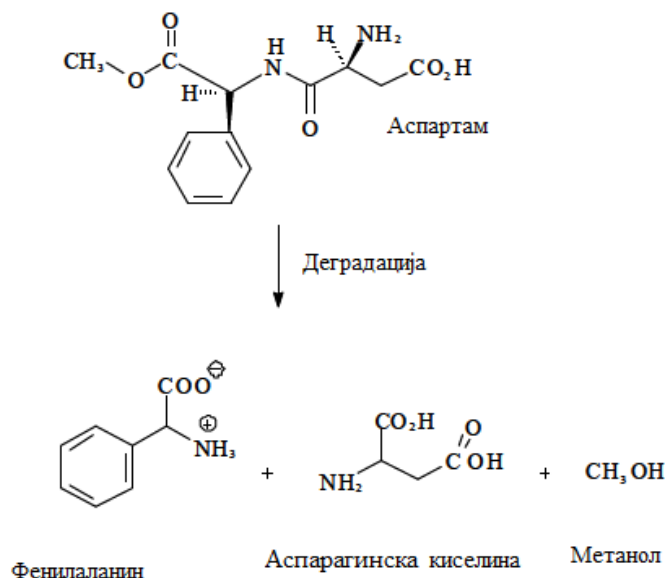
консумација во количество определено со прифатливиот дневен внес (40 mg/kg телесна маса, European Food Safety Authority).

Според доктор Ralph Golan M.D, при постојана употреба и внесување на поголемо количество на аспартам со текот на времето, заради присуството на метил алкохол можно е да дојде до појава на главоболка, губење на свест, панични напади, губење на меморија, промени во расположението, депресија, гастроинтестинални проблеми итн. Мали количества од овој засладувач може да бидат безбедни, меѓутоа може да се јават кумулативни ефекти предизвикани заради синергија во случај кога се консумира храна што има висока содржина на јаглехидрати и ниска содржина на протеини како што се енергетските пјалаци. По консумирање на храна и пијалаци коишто содржат аспартам може да се јават и следниве симптоми: зависност, гадење, халуцинации, грчеви, абнормални дишења, депресија, потешкотии при воспоставување контрола на дијабетисот со инсулин или останати лекови, влошување на дијабетисот како што е ретинопатија, катаракта, невропатија и гастропареза (Wurtman R. J, 1983, 1985, 1986).

Фенилаланинот и аспарагинската киселина може да се најдат во разновидна храна како составен дел на протеините. Аминокиселините од аспартамот се апсорбираат и метаболизираат различно од аминокиселините кои се застапени природно во храната. Протеините и аминокиселините коишто се наоѓаат природно во храната се разложуваат постепено и целосно, а потоа постепено се апсорбираат во организмот. Ова потполно разложување води до мало апсорбирање и мало зголемување на некои аминокиселини. Во случајот со аспартамот, аспарагинската киселина и фенилаланинот (кои се слободни аминокиселини а не протеински) многу брзо се апсорбираат што предизвикува зголемување на овие аминокиселини во организмот. Во однос на метанолот, постојат тврдења дека некои овошни сокови и алкохолни пијалаци содржат мали количества од оваа супстанца (Bagua J., и Bal A. 1995). Од голема важност е да се забележи дека метанолот никогаш не се појавува сам кај овие производи туку

секогаш заедно со него е присутен и етанолот, којшто главно се наоѓа во повисоки концентрации од метанолот. Етанолот претставува антидот на метанолот за луѓето (Woodrow C. M., 1984). Во

аспартамот етанолот не е присутен. Речиси сите компоненти и метаболички продукти на аспартамот се со сомнителна токсичност (Wurtman R. (1985, 1986, 1988).



Слика 1. Деградициски продукти на аспартам

Fig.1. Aspartame degradation products

Оттука заради важноста на неговата контрола во прехранбените производи, произлегува и целта на овој труд: да се образложи влијанието на аспартамот врз здравјето на човекот и да се прикажат

Материјал и методи

Во литературата се сретнуваат податоци за определување на аспартам во различни прехранбени производи како што се: Така на пример, авторите Khesorn Nantachit, Somporn Putiyapan и Prapart Phoowiang (2008) извршиле За идентификација на аспартам ги користеле следниве раствори:

Раствор од нинхидрин: подготвен со растворање на нинхидрин во 50 mL етанол и 10 mL глацијална оцетна киселина.

Раствор од алкален хидроксиламин: Овој раствор може да се подготви на два начина и тоа со растворање на 12,5 g хидроксиламин хидрохлорид во метанол до волумен од 100 mL (1) и со растворање на 12,5 g натриум хидроксид во метанол. Потоа се разредува до 100 mL со истиот растворувач (2).

некои аналитички методи за квалитативно и квантитативно определување на аспартам во храната и пијалациите, заради заштита на здравјето на потрошувачите.

газирани пијалаци, енергетски пијалаци, изотонични пијалаци, засладувачки адитиви, диетални додатоци и др.

идентификација и квантитативно определување на аспартам во 4 различни примероци храна.

Раствор од железо(III) хлорид: Се зема 10,5 g железо(III) хлорид и се раствора со 95 % етанол до волумен од 100 mL.

Методи за идентификација на аспартам: За идентификација на аспартам авторите ги користеле следниве методи:

Метод со раствор од нинхидрин: Идентификацијата на аспартам е извршена со примена на тенкослојна хроматографија (TLC Thin Layer Chromatography). За таа цел, примероците се раствораат во вода и се нанесуваат на хроматографската плоча. Хроматографската плоча се потопува во

мобилна фаза составена од ацетонитрил и фосфатен пуфер (10/90, V/V). Фосфатниот пуфер е подготвен од калиум дихидрогенфосфат, со концентрација 6,8 g/L подесен до рН=3,7 со помош на фосфорна киселина. После развивањето на хроматограмот, хроматографската плоча се суши, се прска со раствор од нинхидрин и се загрева со топол воздух во печка.

Метод со раствор од алкален хидроксиламин: Хроматографската плоча на којашто е нанесен примерокот што содржи аспартам е развиена на ист начин како со нинхидринскиот метод, со таа разлика што наместо со раствор од нинхидрид, хартијата се прска со алкален хидроксиламин и се суши. Потоа се прска со раствор на хлороводородна киселина (1:1) и повторно се суши. На крај се прска со раствор на железо (III) хлорид и повторно се суши.

Колориметриски метод: За подготовка на примерокот за анализа со колориметрискиот метод се зема 1 g од примерокот и се раствора во 40 mL дестилирана вода, а потоа се разредува до волумен од 100 mL со апсолутен етанол. Се зема 1 mL ацетатен пуфер и се меша со 1 mL од растворот од примерокот и 2 mL раствор од нинхидрин. Оваа смеса се загрева во водена бања 8 минути а потоа смесата се раствора со 10 mL апсолутен етанол.

HPLC метод: За HPLC анализата е користен течен хроматограф HPLC (Agilent 1100), опремен со детектор со низа од диоди (DAD, diode array detector). Како стационарна фаза е употребена аналитичка колона од типот Waters Spherisorb ODS 2 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Смеса од ацетонитрил и фосфатен пуфер е користена како мобилна фаза со проток од 1 mL/min.

Резултати и дискусија

Резултати од тестот со нинхидрин: Аспартамот реагира со нинхидринот при што се добива соединение со виолетова боја. Реакцијата се одвива со загревање, а равенката на оваа реакција е прикажана на Сл.2.

После извршениот тест со нинхидрин, на хроматографската плоча се забележува виолетово обојување, што е доказ за присуство на аспартам.

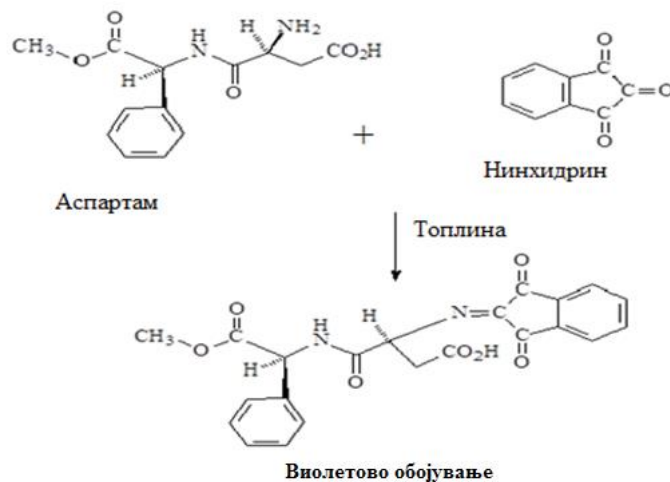
Испитувањето покажало дека долната граница на детекција на овој метод изнесува 7,5 μ g (Nantachit K. и сор., 2008).

Овој метод е чувствителен до 7,5 μ g, но не е специфичен за аспартамот затоа што со овој метод може да се детектираат аминокиселини кои имаат слободна α -амино група.

Резултати од тестот со алкален хидроксиламин: Равенката на хемиската реакција на аспартамот со хидроксиламинот е прикажана на Слика 3. Како краен продукт при оваа реакција се добива комплексно соединение на железо со кафена боја. Затоа при изведување на овој тест, присуството на аспартам е означено со кафено обојување на хроматографската плоча.

Лимитот на детекција на аспартамот на овој метод изнесува 300 μ g (Nantachit K. и сор., 2008). Во споредба со тестот со нинхидрин може да се заклучи дека овој метод е помалку осетлив.

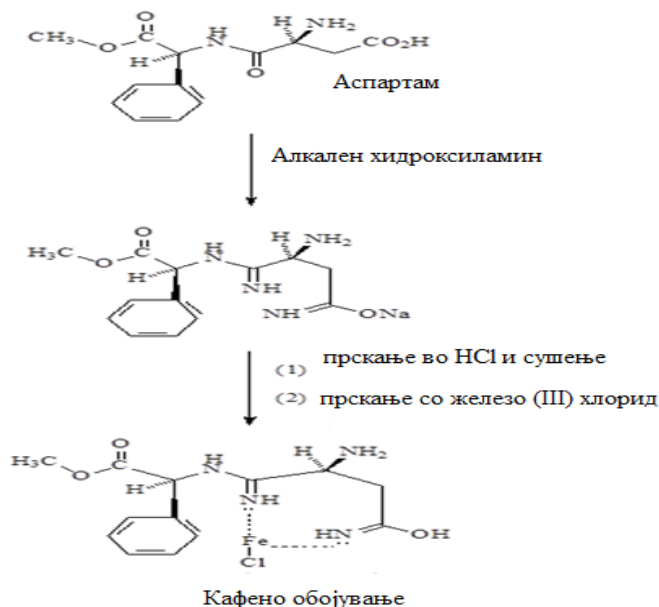
Методот со примена на раствор од алкален хидроксиламин не е чувствителен, но е специичен за аспартамот и се користи за детекција на карбонилни групи што формираат обоен комплекс со раствор од железо(III)хлорид.



Слика 2. Равенка на хемиска реакција на нинхидрин со аспартам
Fig.2. Equation of chemical reaction between ninhydrine and aspartame

Резултати од анализата со колориметрискиот метод: Аспартамот во видливиот дел на спектарот покажува максимална апсорпција на 406 nm и 557 nm. Апсорпцијата на 406 nm е стабилна и затоа мерењето е изведено на оваа бранова должина. Виолетовата боја на растворот од примерокот е стабилна најмалку 1,5 часа. Испитувањата покажале дека методот е линеарен во концентрациско подрачје од 7,5 до 37,5 $\mu\text{g/mL}$. Колориметрискиот

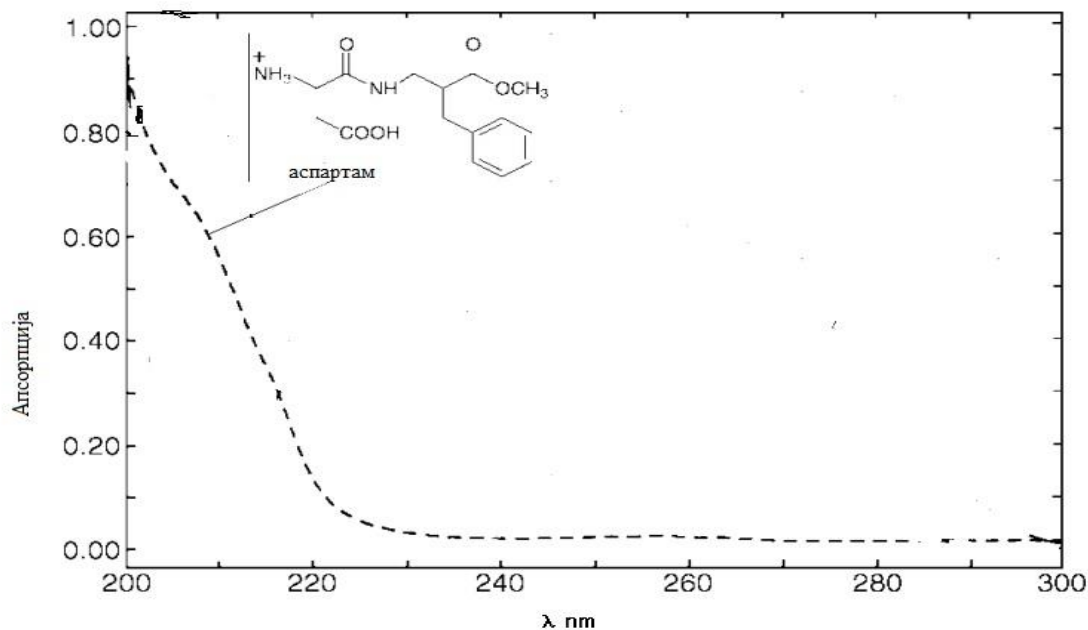
метод се карактеризира со мала прецизност, бидејќи аспартамот е хирално соединение кое е нестабилно и се распаѓа под дејство на топлина. Пресметаните вредности за релативната стандардна девијација (RSD) изнесуваат од 5-6 %. Овој метод се одликува со задоволителна точност, што се потврдува преку вредностите за аналитичкиот принос, којшто изнесува околу 97 %.



Слика 3. Равенка на хемиска реакција на алкален хидроксиламин со аспартам
Fig.3. Equation of chemical reaction between alkaline hydroxylamine and aspartame

Резултати од HPLC анализата: Имајќи го предвид UV спектарот на аспартам (Сл. 4)

јасно е зошто хроматографскиот процес е следен на бранова должина од 214 nm.

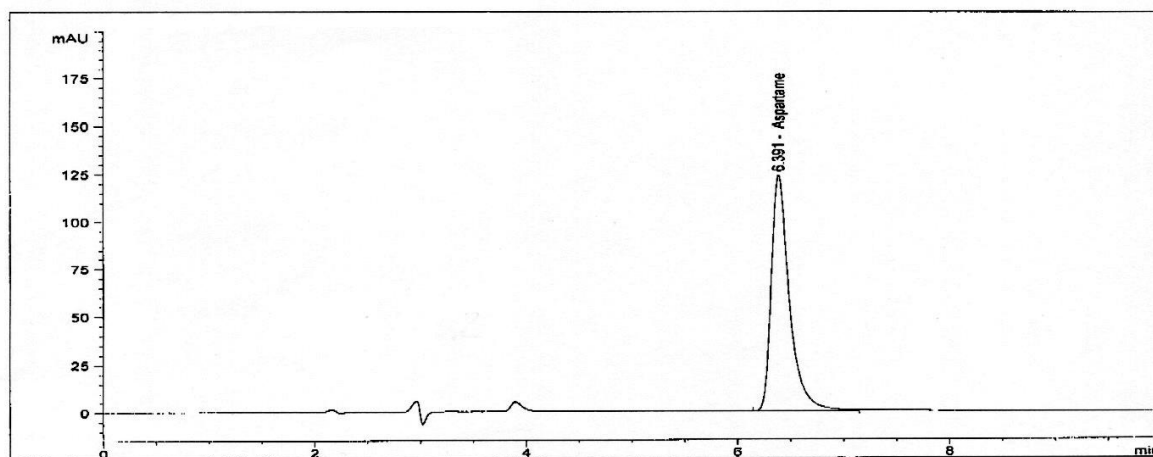


Слика 4. UV спектар на аспартам

Fig.4. UV spectra of aspartame

Како резултат на тоа што аспартамот на топло се деградира, HPLC методот може да даде помалку прецизни резултати доколку примероците не се чуваат соодветно. Пресметаните вредности за RSD се движат

од 3 до 11 %. Вредностите за аналитичкиот принос на овој метод не се разликуваат од оние добиени со колориметрискиот метод (~97 %).



Слика 5. Хроматограм од аспартам во анализиран примерок добиен со HPLC методот

Fig.5. Chromatogram of aspartame in sample matrix obtained by HPLC method

При анализирање на примероците со двете методи е утврдено дека аспартамот е определен во помали количества од декларираниите. Ова се должи на тоа што најверојатно примероците се чуваат

несоодветно, при што аспартамот се деградирал (Nantachit K. и соp., 2008).

На Слика 5. е даден хроматограм од аналитичкиот стандард на аспартам добиен од HPLC анализата. Како што може да се види од хроматограмот, потребното време

за елуирање на аспартамот при опишаните услови на работа е околу 6,4 min.

Заклучок

Аспартамот е адитив којшто се користи при производство на различни производи наменети за исхрана на човекот. Идеален е како средство за засладување поради малите концентрации коишто се користат за да се постигне посакуваниот ефект, меѓутоа, многубројни се неговите негативни ефекти врз човековото здравје.

И покрај големиот број на студии што укажуваат на штетноста на аспартамот по здравјето на човекот, тој продолжува да се користи. Од овие причини, од особена важност е контролата на количеството на аспартам во прехранбените производи заради заштита на здравјето на потрошувачите.

Литература

1. Soffritti M., Padovani M., Tibaldi E., Falcioni L., Manservigi F. and Belpoggi F., (2014) The Carcinogenic Effects of Aspartame: The Urgent Need for Regulatory Re-Evaluation, AMERICAN JOURNAL OF INDUSTRIAL MEDICINE, 1-15.
2. Ager D. J., Pantaleone D. P., Henderson S. A., Katritzky A. R., Prakash I., Walters D. E. (1998). Commercial, Synthetic Non-nutritive Sweeteners. *Angewandte Chemie International Edition* 37 (13–24), 1802–1817.
3. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive, (2013), EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), , Parma, Italy, 1-263.
4. Nantachit K., Putiyanan S., Phoowiang P. (2008). Identification and determination methods of aspartame. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 3(2), 214-218.
5. Wurtman R. J. (1983). Neurochemical Changes Following High-Dose Aspartame with Dietary Carbohydrates. *New England Journal of Medicine*, 389, 429-430
6. Wurtman R. (1985). Aspartase: Possible effect on seizure susceptibility. *Lancet* 2, 1060.
7. Wurtman R. J., Walker E. R. (1988). *Dietary Phenylalanine and brain function*. Birkhauser, Boston.
8. Walton R. (1986). Seizure and mania after high intake of aspartase. *Psychosomat* 27, 218-219.
9. Roberts H. J. (1988). Reactions attributed to aspartame containing products. *Journal of Applied Nutrition* 40, 85-94.
10. Barua J., Bal A. (1995). Emerging facts about aspartame. *Journal of the diabetic association of India*, vol.35, No.4.
11. Woodrow C. M. (1984). Aspartame: Methanol and the public health. *Journal of applied nutrition*, 36 (1), 42-53.