

## **OCENA ZAWARTOŚCI CYKLAMINIANU SODU W NAPOJACH BEZALKOHOLOWYCH**

**Anna Czajkowska-Mysiek, Magdalena Gajewska, Beata Bartodziejska**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Oddział Chłodnictwa i Jakości Żywności

Zakład Jakości Żywności

92-202 Łódź, al. M. J. Piłsudskiego 84

anna.czajkowska@och-ibprs.pl

### **Streszczenie**

Oceniono zawartość cyklamianu sodu w wybranych napojach bezalkoholowych słodzonych sztucznymi substancjami słodzącymi. W badaniach wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem diodowym (DAD). Badane próbki poddano derywatywacji prekolumnowej, a utworzone pochodne oznaczano przy długości fali 314 nm. Badaniami objęto 17 rynkowych napojów bezalkoholowych gazowanych i niegazowanych, słodzonych cyklamianem sodu. W analizowanych napojach zawartość cyklamianu sodu mieściła się w zakresie od 105,3 mg/l do 273,3 mg/l. Nie stwierdzono przekroczenia maksymalnej dopuszczalnej zawartości 281 mg/l cyklamianu sodu dla napojów bezalkoholowych.

**Słowa kluczowe:** cyklamian sodu, napoje bezalkoholowe, HPLC-DAD

## **THE ASSESSMENT OF SODIUM CYCLAMATE CONTENTS IN SOFT DRINKS**

### **Summary**

The aim of the study was the determination of sodium cyclamate content in some soft drinks sweetened with artificial sweeteners. In the study the high performance liquid chromatography (HPLC) method with diode array detector (DAD) were used. The samples were analyzed after precolumn derivatization and the creative derivatives were analyzed in wavelength 314 nm. The study included 17 market carbonated and non-carbonated soft drinks sweetened with sodium cyclamate. In analyzed soft drinks sodium cyclamate content ranged from 105,3 mg/l to 273,3 mg/l. There was found, no exceeded the maximum level 281 mg/l of sodium cyclamate in soft drinks.

**Key words:** sodium cyclamate, soft drinks, HPLC-DAD

## WSTĘP

Produkcja napojów bezalkoholowych w Polsce wykazuje systematyczną tendencję wzrostową. Dzięki ogromnej różnorodności dostępnych na rynku napojów bezalkoholowych wzrasta także ich konsumpcja. W 2008 r. w Polsce łączne, bilansowe spożycie napojów bezalkoholowych wyniosło 183 l/mieszkańca i było wyższe o 16% w porównaniu ze średnią z lat 2004–2006 [Nosecka 2009]. Szczególny wzrost odnotowano w spożyciu niegazowanych produktów smakowych o obniżonej wartości kalorycznej, produkowanych na bazie wód mineralnych i źródlanych z dodatkiem substancji słodzących. Coraz większą popularnością cieszą się napoje, należące do tzw. grupy produktów „Better for You”, posiadających zmniejszoną w stosunku do produktu regularnego zawartość substancji niekorzystnej dla zdrowia np. cukru lub tłuszczu. Do tych produktów zaliczane są napoje bezalkoholowe (głównie gazowane) bez cukru, tzw. „light” lub „diet” [Linowski 2008]. To właśnie rozwój tej grupy produktów, podyktowany najpoważniejszą bolączką krajów rozwiniętych i rozwijających się, jaką jest otyłość, wymusza stosowanie innych naturalnych środków intensywnie słodzących (taumatyna, glicyryzyna, stewiozydy) lub syntetycznych substancji słodzących (sacharyna, aspartam, acesulfam K, cyklamian, neohesperydyna, sukraloza, alitam, neotam), które naturalnie nie występują w środowisku, lecz są otrzymywane na drodze syntezy chemicznej [Waszkiewicz-Robak i in. 2007]. Najczęściej w jednym produkcie stosuje się mieszaninę co najmniej dwóch syntetycznych substancji słodzących. Obecnie w napojach bezalkoholowych coraz częściej stosowane są substancje intensywnie słodzące [Waszkiewicz-Robak 2011; Stanner 2010]. Dodawanie ich do żywności jest uwarunkowane głównie ich właściwościami funkcjonalnymi. Zastąpienie naturalnych substancji słodzących sztucznymi obniża koszty produkcji, co przekłada się na niższą cenę detaliczną produktu [Bartodziejska i in. 2008]. Ponadto każda z tych substancji charakteryzuje się odmiennymi właściwościami. W porównaniu z sacharozą (o słodyczy uznanej za 1), najniższą słodycz wykazuje cyklamian sodu (30–40 razy słodszy), następnie aspartam i acesulfam K (150–200 razy słodsze) oraz sacharyna (300–800 razy słodsza) [Miśkiewicz i in. 2012].

Cyklaminiany (sole sodu i wapnia kwasu cykloheksylosulfonowego) to elektrolity, które silnie jonizują w roztworach i posiadają małą pojemność buforową. Przypadkowe odkrycie w 1937 r. przez Michaela Sveda cyklamianu oraz w kolejnych latach pozostałych słodzików stworzyło fundament pod powstanie kategorii napojów bezcukrowych. Cyklaminiany (E 952) są dobrze rozpuszczalne w wodzie i stabilne w wysokich temperaturach, co umożliwia ich stosowanie w żywności pieczonej i gotowanej [Świdorski 1999]. Związki te są stabilne w szerokim zakresie pH (2–10) oraz nie są metabolizowane w organizmie. Ze względu na brak

grup chromoforowych w cząsteczce cyklaminianu, umożliwiającą bezpośrednią identyfikację tego związku w świetle UV, w celu jego analizy najczęściej przeprowadza się upochodnienie. Drugim sposobem jego oznaczania jest bezpośrednia analiza poprzez zastosowanie metod HPLC-MS lub HPLC-ESI-MS [Zygler i in. 2009]. Cyklaminiany wykazują synergizm z sacharyną, przez co maskują jej niekorzystny metaliczny posmak [Miśkiewicz, Nabesny 2012], stosuje się je zazwyczaj w stosunku wagowym 10:1 (czasem 9:1). Pod wpływem mikroflory bakteryjnej cyklaminiany mogą ulec przemianie w cykloheksyloaminy uważane za związki rakotwórcze [Newberne, Conner 1986]. We wczesnych latach 70. cyklaminiany podejrzewane były właśnie o właściwości rakotwórcze. Z tego też powodu ich użycie w żywności zostało w wielu państwach zakazane (m.in. w Kanadzie, Polsce, USA i Wielkiej Brytanii) lub znacznie ograniczone, m.in. poprzez wymóg stosowania etykiet ostrzegawczych. Ponowna ocena danych toksykologicznych wskazała jednak na brak takich właściwości. Obecnie stosowanie cyklaminianów jest dozwolone w ok. 50 krajach, m.in. w Europie i Chinach [Kroger i in. 2006; Zhu i in. 2005]. Jak do tej pory stosowanie tej substancji słodzącej jest nadal niedozwolone w USA. Ze względu na możliwość metabolizowania przez organizm nawet w 85% powstałej cykloheksyloaminy ustalono dla cyklaminianów ADI (dopuszczalne dzienne spożycie) na poziomie 11 mg/kg masy ciała. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) zaleca także, aby czystość cyklaminianów dodawanych do żywności nie była mniejsza niż 98%. Nadal jednak prowadzone są badania nad metabolizowaniem cyklaminianu [Renwick i in. 2004], m.in. ze względu na wpływ dużych dawek cykloheksyloaminy na zanik jąder u szczurów. Przeprowadzone badania wykazały jednak brak wpływu obu tych związków na bezpłodność mężczyzn [Serra-Majem i in. 2003].

Cyklaminiany są stosowane głównie jako dodatek do gum do żucia, lodów, deserów, syropów oraz napojów. Aktem prawnym regulującym stosowanie cyklaminianu jako dodatku do żywności jest Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. (Dz. U. 2010 nr 232, poz. 1525). Cyklaminian sodu i wapnia może być stosowany w napojach bezalkoholowych w maksymalnej ilości 250 mg/l (w przeliczeniu na wolny kwas). Według rozporządzenia substancje słodzące nie mogą być stosowane w żywności dla niemowląt i małych dzieci, w tym również w żywności dietetycznej specjalnego przeznaczenia medycznego dla niemowląt i małych dzieci.

Ze względu na fakt stosowania w coraz większym zakresie substancji słodzących oraz ich potencjalną toksyczność istnieje konieczność limitowania i monitorowania zawartości tych substancji w artykułach spożywczych [Sękalska 2007].

Celem niniejszej pracy była ocena zawartości cyklaminianu sodu w napojach

bezalkoholowych zawierających tę substancję słodzącą, dostępnych na rynku detalicznym.

### **MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

Badaniami objęto 17 rynkowych napojów bezalkoholowych wyprodukowanych przez różnych producentów. Badane napoje podzielono na kilka grup: napoje typu cola (4 produkty), napoje typu ice tea (2 produkty), napoje smakowe (5 produktów), napoje typu tonic (3 produkty) oraz napoje funkcjonalne (3 produkty). Przeprowadzone badania dotyczyły napojów bezalkoholowych gazowanych i niegazowanych, dostępnych na rynku detalicznym regionu łódzkiego. Poszczególne napoje różniły się stosowanymi substancjami słodzącymi (cukier i/lub mieszanka słodzików: acesulfam K, sacharynian sodu, aspartam, cyklamian sodu).

Zawartość cyklamianu sodu w przeliczeniu na kwas cykloheksylosulfonowy oznaczono z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD), według PN-EN 12857:2002.

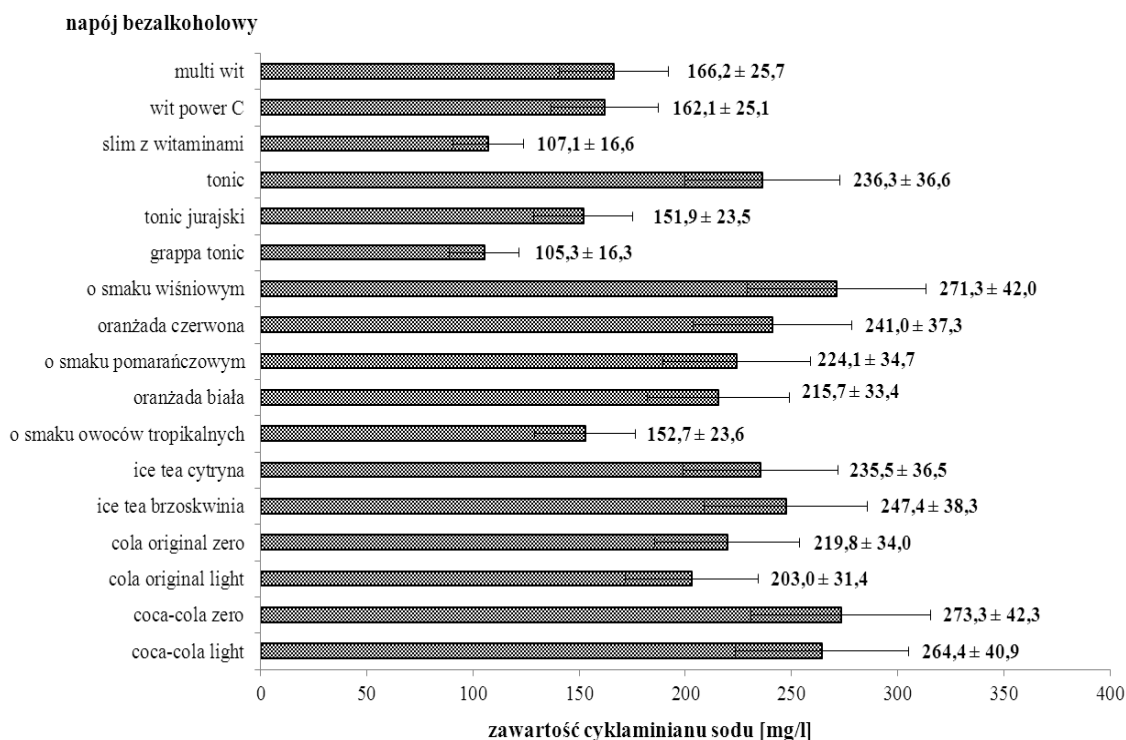
Zastosowana metodyka badań została zwalidowana, umożliwiając oznaczenie cyklamianu sodu z powtarzalnością wynoszącą  $\leq 6\%$  i dokładnością 80–115%. Do analiz wykorzystano chromatograf cieczowy Performance firmy Schimadzu w układzie dwukanałowym, wyposażonym w autosampler i detektor SPD-M20A pracujący przy długości fali 314 nm. Do rozdzielania zastosowano kolumnę monolityczną z fazą odwróconą Onyx Monolithic C18 firmy Phenomenex o wymiarach 100 mm×4,6 mm, poprzedzoną prekolumną o tym samym wypełnieniu i wymiarach 10 mm×4,6 mm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanol/woda w stosunku 80:20 (v/v) i przepływie 1,0 ml/min. Przed rozpoczęciem analiz kolumnę kondycjonowano przez 30 min 1% roztworem EDTA.

W celu uzyskania pochodnych cyklamianu (N,N-dichlorocykloheksyloamina) pobierano 20 ml roztworów próbek lub roztworów wzorca do rozdzielacza, dodawano 1 ml 50% (m/m) kwasu siarkowego, 10 ml n-heptanu i 2,5 ml roztworu podchlorynu sodu (1,7% aktywnego chloru) i wytrząsano na wytrząsarce przez 2 min. Po rozdzieleniu faz, górną warstwę organiczną przemywano 25 ml 5% roztworu węglanu sodu i wytrząsano przez 1 min. Zebraną fazę osuszano siarczanem sodu i umieszczano w viali autosamplera. Każdy napój analizowano w dwóch powtórzeniach, a otrzymane wyniki oszacowano statystycznie przy użyciu programu Statistica 10. Identyfikację cyklamianu sodu w napojach przeprowadzono poprzez porównanie czasu retencji sygnału pochodzącego od tego związku w próbkach z sygnałem otrzymanym od roztworu substancji wzorcowej. Do oceny zależności pomiędzy powierzchnią otrzymanych pików badanych związków a ich zawartością w próbkach wykorzystano analizę regresji prostej.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 17 badanych napojów większość stanowiły napoje gazowane (59%). Dość wysoki udział napojów niegazowanych (41%) w materiale badawczym wskazuje na zwiększanie się udziału w rynku napojów bezalkoholowych niegazowanych słodzonych sztucznymi substancjami słodzącymi. Przeważającą ilość napojów (71%) stanowiły napoje słodzone mieszanką czterech substancji słodzących (acesulfam K, aspartam, sacharynian sodu i cyklamian sodu), pozostałe 29% było słodzone mieszanką acesulfamu K, aspartamu i cyklamianu sodu. Potwierdza to fakt, że producenci wykorzystują efekt synergistyczny tych substancji słodzących. Na podstawie danych zamieszczonych na etykietach produktów stwierdzono także, że napoje typu cola nie zawierają w mieszaninie słodzików sacharynianu sodu.

W celu oznaczenia zawartości cyklamianu sodu w napojach wykonano krzywą kalibracyjną w zakresie stężeń 12–929 mg/l. Otrzymane wyniki badań analizowanych napojów przedstawiono na rysunku 1.

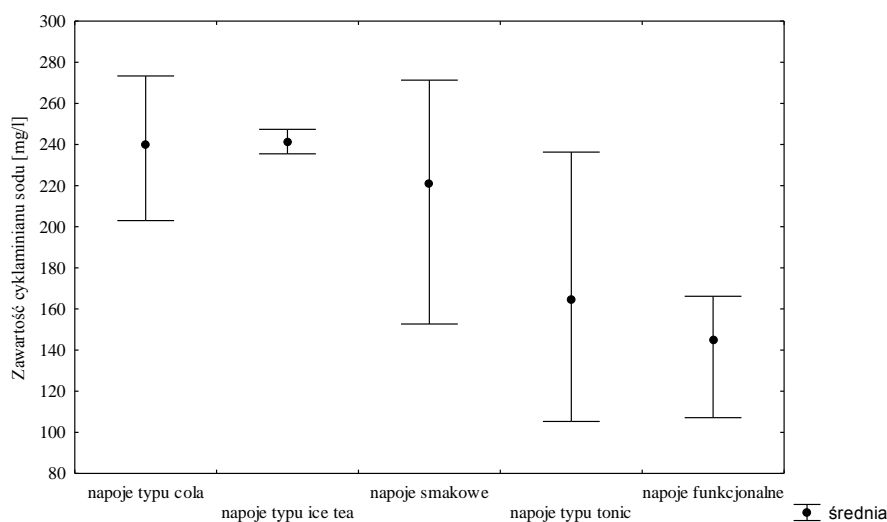


Podane wartości niepewności stanowią niepewność rozszerzoną przy poziomie ufności 95% dla współczynnika rozszerzenia  $k=2$ .

**Rysunek 1.** Zawartość cyklamianu sodu w napojach bezalkoholowych  
*Sodium cyclamate contents in soft drinks*

Uzyskane zawartości cyklamianu sodu mieściły się w zakresie od 105,3 mg/l (grappa tonic) do 273,3 mg/l (coca-cola zero). Na podstawie przeprowadzonych badań, w żadnym z 17 napojów bezalkoholowych nie stwierdzono przekroczenia maksymalnej dopuszczalnej ilości 250 mg/l kwasu cykloheksylosulfonowego (281 mg/l cyklamianu sodu). Badane napoje zawierały cyklamian sodu w ilości od 38% (grappa tonic) do 97% (coca-cola zero) najwyższej dopuszczalnej jego zawartości.

Otrzymane wyniki badań zawartości cyklamianu sodu pogrupowano w zależności od typu napoju (rysunek 2).



**Rysunek 2.** Porównanie minimalnych, maksymalnych i średnich zawartości cyklamianu sodu otrzymanych dla poszczególnych grup napojów bezalkoholowych  
*Comparison of minimum, maximum and average content of sodium cyclamate obtained for each group of soft drinks*

W obrębie grup napojów najniższą zawartością cyklamianu sodu charakteryzowały się napoje funkcjonalne (średnio 145,1 mg/l), natomiast najwięcej tej substancji zawierały napoje typu ice tea (średnio 241,4 mg/l) oraz typu cola (średnio 240,1 mg/l).

W celu interpretacji uzyskanych wyników badań obliczono dzienne spożycie cyklamianu sodu, przyjmując założenie, że osoba dorosła waży 70 kg, a dziecko 30 kg, oraz zakładając, że wypiją oni 1 l napoju dziennie (tabela 1).

**Tabela 1.** Dzielne spożycie cyklaminianu sodu z 1 l napoju przez osobę dorosłą i dziecko

*The daily intake of sodium cyclamate from 1 liter of the beverage by an adult and a child*

ADI [mg/kg m. c.]	Średnia zawartość cyklaminianu sodu w badanych napojach [mg/l]	Osoba dorosła		Dziecko	
		ADI [mg/70 kg]	% ADI	ADI [mg/30 kg]	% ADI
11	205	770	27	330	62

Z obliczeń wynika, że konsument, wypijając dziennie 1 l napoju słodzonego cyklaminianem sodu, nie przekracza ustalonego dopuszczalnego dziennego spożycia tej substancji. Osoba dorosła o masie 70 kg dostarcza organizmowi średnio 27% ADI dla cyklaminianów, natomiast dziecko o masie 30 kg spożywa 62% ADI.

### WNIOSKI

Oceniając zawartość cyklaminianu sodu w 17 napojach bezalkoholowych słodzonych sztucznymi substancjami słodzącymi, stwierdzono:

1. W żadnym z 17 napojów bezalkoholowych nie stwierdzono przekroczenia maksymalnej zawartości 250 mg/l kwasu cykloheksylosulfonowego (281 mg/l cyklaminianu sodu).
2. Osoba dorosła o masie 70 kg, wypijając dziennie 1 l napoju bezalkoholowego zawierającego cyklaminian sodu, dostarcza organizmowi średnio 770 mg cyklaminianu sodu (27% ADI), natomiast dziecko o masie 30 kg spożywa 330 mg tej substancji (62% ADI).

### PIŚMIENNICTWO

1. Bartodziejska B., Cis A., Paziak-Domańska B. (2008). Wpływ warunków przechowywania na jakość napojów bezalkoholowych słodzonych aspartamem i mieszaniną aspartam/acesulfam K. Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż. 63, 63-76
2. Kroger M., Meister K., Kava R. (2006). Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety, 5, 35-47
3. Linowski M. (2008). Światowy rynek słodzików a napoje „Better for You”. Przem. Ferm. Owoc.-Warz. 7-8, 10-12
4. Miśkiewicz K., Nebesny E., Rosicka-Kaczmarek J. (2012). Podział i charakterystyka substancji intensywnie słodzących stosowanych w żywności (cz. II). Prz. Piek. Cukier. 7, 54-55
5. Miśkiewicz K., Rosicka-Kaczmarek J., Nebesny E. (2012). Substancje słodzące w produktach spożywczych. Prz. Piek. Cukier. 2, 58-59

6. Newberne P. M., Conner M. W. (1986). Food additives and contaminants. An update. *Cancer*, 58, 1851-1862
7. Nosecka B. (2009). Napoje bezalkoholowe. Produkcja, ceny, spożycie. *Przem. Spoż.* 6, 10-13
8. PN-EN 12857: 2002 Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości cyklamianu. Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej
9. Renwick A. G., Thompson J. P., O'Shaughnessy M., Walter E. J. (2004). The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in human during long-term administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 367-380
10. Rozporządzenie MRiRW z dn. 22 listopada 2010 r. (z późniejszymi zmianami) w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych
11. Sękalska B. (2007). Zawartość sztucznych substancji słodzących – aspartamu, acesulfam-K i sacharynianu sodu w napojach dietetycznych. *Żyw. Nauka. Technol. Jakość*, 3, 52, 127-138
12. Serra-Majem L., Bassas L., Garcia-Glossas R., Ribas L., Ingles C., Cesals I., Saavedra P., Renwick A. G. (2003). Cyclamate intake and cyclohexylamine excretion are not related to male fertility in humans. *Food Addit. Contam.* 20, 1097-1104
13. Stanner S. (2010). The science of low-calorie sweeteners – separation fact from fiction. *British Nutrition Foundation. Nutrition Bull.* 35, 357-362
14. Świdorski F. (1999): *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. W: *Substancje słodzące*. Warszawa: WNT
15. Waszkiewicz-Robak B. (2011). Substancje dodatkowe w produktach spożywczych – cz. II. *Przem. Spoż.* 9, 65, 28-30
16. Waszkiewicz-Robak B., Świąder K., Świdorski F. (2007). Substancje intensywnie słodzące – cz. I. Właściwości i warunki ich stosowania w żywności. *Przem. Spoż.* 5, 22-26
17. Zhu Y., Guo Y., Ye M., James F. S. (2005). Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *J. of Chrom. A*, 1085, 143-146
18. Zyglar A., Wasik A., Namieśnik J. (2009). Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trends in Anal. Chem.* 28, 9, 1082-1102