

Stanovení rebaudiosidu A v ochucených pivech, nápojích na bázi piva a limonádách

Determination of Rebaudioside A in Mixed beer, Beer-based Beverages and Lemonades

Marie JURKOVÁ, Jana OLŠOVSKÁ

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / *Research Institute of Brewing and Malting, plc., Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2*
e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / *Reviewed paper*

Jurková, M. – Olšovská, J.: Stanovení rebaudiosidu A v ochucených pivech, nápojích na bázi piva a limonád. *Kvasny Prum.* 61, 2015, č. 9, s. 268–272

Stevie sladká se stává oblíbeným sladidlem v potravinářském průmyslu. Sladkou chuť způsobují diterpenické sloučeniny tzv. steviol glykosidy, které jsou nekalorické a mají sladivost asi 300 vyšší než sacharosa. Pouze derivát rebaudiosid A má přijatelné sensorické vlastnosti, ostatní analogy jsou nahořklé až nepříjemně hořké. Jelikož se toto sladidlo používá také k doslazování nápojů včetně oblíbených ochucených piv, byla vyvinuta rychlá rutinní analytická metoda stanovení rebaudiosidu A v těchto nápojích a limonádách pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Pro separaci steviol glykosidů bylo využito HILIC principu, který je vhodný pro velmi polární a hydrofilní analyty. Metoda je selektivní, dobře opakovatelná a má vysokou výtěžnost 90–100 %.

Jurková, M. – Olšovská, J.: Determination of rebaudioside A in mixed beer, beer-based beverages and lemonades. *Kvasny Prum.* 61, 2015, No. 9, pp. 268–272

The plant *Stevia rebaudiana* (Stevia sweet) is becoming a favourite sweetener in the food industry. Sweet taste is caused by diterpenic glycosides, so-called steviol glycosides, which lack calories while being 300 times sweeter than sucrose. While all the other glycosides are slightly or even disagreeably bitter, rebaudioside A possesses desirable sensorial properties. Because this sweetener is used to sweeten beverages including mixed beer, a fast routine analytical method was developed using HPLC with UV detection for determination of rebaudioside A in mixed beer and lemonade. The HILIC principle, which is suitable for separation of polar and hydrophilic analytes, was used for separation of steviol glycosides. The method is selective, reproducible and has a high recovery of 90–100 %.

Jurková, M. – Olšovská, J.: Feststellung des Rebaudiosids A in den auf Basis Bier und Limonaden hergestellten aromatisierten Getränken. *Kvasny Prum.* 61, 2015, Nr. 9, S. 268–272

Für die Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie ist Stevia Süß ein beliebter Süßstoff geworden. Der süße Geschmack verursacht diterpenische Verbindungen sogenannte Steviol Glykosiden, die Kalorienfrei sind, und ihre Süßigkeit im Vergleich mit Saccharose etwa 300mal höher ist. Nur Derivat Rebaudiosid A hat akzeptable sensorische Eigenschaften, andere Analoge sind ein bisschen bis unangenehm bitter. Weil dieser Süßstoff wird zur Nachsüßung von Getränken einschließlich der beliebten flavored Biere angewandt, wurde eine schnelle Routinemethode der Bestimmung des Rebaudiosids A in diesen und alkoholfreien Getränken mittels Flüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion entwickelt. Für Separation der Steviol Glykosiden wurde ein HILIC Prinzip angewandt, das für hochpolare und Hydrophilanalyte geeignet ist. Es handelt sich um eine selektive Methode, mit einer guten Reproduzierbarkeit und guter Ausbeute 90–100 %.

Klíčová slova: *Stevie, náhradní sladidlo, pivo, HPLC-UV, HILIC*

Keywords: *Stevia, sweetener, beer, HPLC – UV, HILIC*

1 ÚVOD

Stevie sladká (*Stevia rebaudiana*) pochází z Jižní Ameriky, je hojně rozšířena také v Asii, zejména v Japonsku, a je užívána jako přírodní nekalorická náhrada sacharózy.

V roce 1931 izolovali francouzští chemici z listů rostliny základní glykosidy steviosid a rebaudiosid A. Jedná se o diterpenické sloučeniny s vysokou sladivostí až 300x vyšší než má sacharosa. Tyto látky jsou obsaženy i v ostatních částech rostliny s výjimkou kořenů. Podíl steviosidu činí cca 10 % a rebaudiosidu A 2–4 % v suchých listech. Listy stevie obsahují další diterpenické sloučeniny, avšak v nižším zastoupení. Obvykle je v listech přítomno osm steviol glykosidů: steviosid, steviolbiosid, rebaudiosid (A, B, C, D, E) a dulcosid A. Diterpenické steviol glykosidy chutnají nahořkle, s výjimkou rebaudiosidu A, který má hořkost minimální. Nejvíce produkovaný steviosid vykazuje znatelnou, někdy až nepříjemnou hořkost (Prakash et al., 2008), a proto je v potravinářském a nápojářském průmyslu využíván pouze extrakt rebaudiosidu A. Jeho extrakty se mohou lišit obsahem i čistotou výsledného produktu v závislosti na původu rostliny a podmínkách extrakčního postupu. Kromě steviol glykosidů mohou být v extraktech stevie přítomny i látky, které žádnou sladkost nevykazují.

Celosvětový trend „znovuobjevení stevie“ jako potravinového doplňku znamenal překonání řady předsudků a překážek ze strany lobbistických skupin, neboť stevie se stala vážným konkurentem dosud používaných umělých sladidel. FDA úřad pro kontrolu potravin a léčiv

1 INTRODUCTION

Sweet stevia (*Stevia rebaudiana*) is native to South America, plentifully spread in Asia, especially in Japan and is used as a non-caloric sugar substitute.

French chemists isolated basic glycosides stevioside and rebaudioside A from plant leaves in 1931. They are diterpenic compounds with high sweetness, approximately 300 times sweeter than sucrose, and are contained in all parts of this plant with the exception of roots. Dry leaves contain about 10% of stevioside and 2–4% rebaudioside A. The stevia leaves contain altogether eight diterpenic steviol glycosides: stevioside, steviolbioside, rebaudioside (A, B, C, D, E) and dulcoside A; their concentration is minor. Diterpenic steviol glycosides have a slightly bitter taste except for rebaudioside A, which has minimal bitterness. The major produced compound, stevioside, exhibits appreciable unpleasant bitterness (Prakash et al., 2008) and rebaudioside A extract of it is therefore the only one used in food and beverage industry. Rebaudioside A extracts can differ in the content and purity of the final product depending on plant origin and extraction technique. Apart from steviol glycosides, extracts of stevia can contain also other compounds without any sweetness.

The worldwide “stevia rediscovery” as a food supplement required the overcoming of numerous obstacles presented by lobbyist groups since it represented a significant competition to other artificial sweeteners then in use. The US Food and Drug Administration FDA recognized stevia as a food supplement only in 1995; before that

v USA teprve v roce 1995 uznal stevii jako doplněk stravy. Do té doby směla být používána pouze v kosmetickém průmyslu, ačkoli její bezpečné užívání bylo známo více jak 1500 let. Postoj FDA byl ovlivněn zejména zavádějícími studiemi profesora Mauro Alvareze z Brazílie z roku 1988, které stevii připisoval antikoncepční vlastnosti, dokonce neplodnost mužů i žen. Musela být proto provedena řada studií, která tento mýtus vyvrátila. Téměř o 40 let bylo proto zdrženo odsouhlasení FDA stevie jako běžného sladidla, které nevykazuje žádný kontraktivní efekt. Ani žádné další nejmodernější studie vliv na infertilitu nepotvrdily (Kumar et al., 2008).

Také v Evropské unii předcházela uznání stévie jako přidatné látky do potravin s označením E960 řada diskuzí a studií, které byly ve svých postojích značně nejednotné. Teprve od 2. prosince 2011 byly steviol glykosidy v EU registrovány jako povolené náhradní sladidlo. Toto schválení se vztahuje na rebaudiosid A s obsahem nejméně 95 % čisté látky a na směsi steviol glykosidů s celkovým obsahem rovněž vyšším než 95 %.

Podle společného výboru expertů pro potravinářská aditiva (JEFCA) Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO) je přijatelný denní příjem pro steviol glykosidy vyjádřený jako ekvivalent steviolu 4 mg na kg tělesné hmotnosti a den (US Food and Drug Administration, 2008, JEFCA 2008). Jako nekalorické sladidlo si rebaudiosid A našel cestu do všech odvětví potravinářského průmyslu, v nápojovém průmyslu se využívá zejména ke slazení limonád a sirupů. V poslední době se stále častěji objevují na trhu piva ovocná, v nichž právě rebaudiosid A našel velké uplatnění. Jeho mírně nahořklá chuť velmi dobře ladí s hořkým charakterem piva, a proto rebaudiosid A stále častěji nahrazuje umělá sladidla, např. aspartam.

Nejrozšířenější metodou pro stanovení steviol glykosidů je HPLC, existuje také několik metod využívajících techniku tenkovrstvé chromatografie, kapilární elektroforézy nebo některé spektroskopické metody (NIR, VIS). Výběr separačních podmínek v HPLC je závislý na polárních vlastnostech glykosidů, při volbě UV detekce je rozsah použitelných absorpcí zúžen na oblast krátkých vlnových délek. Přehled původních metod používaných pro stanovení steviol glykosidů shrnuje práce z roku 1998 (Bovanová, 1998). Zveřejněné metody HPLC popisují separaci steviol glykosidů zejména na chromatografických kolonách s funkčními skupinami NH_2 nebo C18, mobilní fázi tvoří většinou acetonitril nebo methanol v různém poměru s vodou. Optimalizační podmínky pro získání rebaudiosidu A z listů stévie pomocí Soxhlet extraktoru s následným HPLC stanovením na koloně C18 s mobilní fází acetonitril/voda 80/20 (v/v) popisuje práce autorů Afandi et al. (Afandi, 2013). Přípravu kapalných vzorků na SPE (Solid Phase Extracion) fázi před HPLC analýzou publikovali Bovanová et al. (1998).

V současné době je pro separaci velmi polárních a hydrofilních sloučenin používána nová technika, založená na principu hydrofilních interakcí v kapalinové chromatografii (HILIC). Alpert (Alpert, 1990) navrhl označení „chromatografie hydrofilních interakcí“ (HILIC) pro chromatografii na kolonách typických pro systémy s normálními fázemi, které ale využívají vodně-organické mobilní fáze podobné jako RP systémy. Slovo „hydrofilní“ charakterizuje afinitu k vodě, která se přidává do mobilních fází při HPLC separacích na polárních kolonách. HILIC technika našla nejprve uplatnění při separacích sacharidů, aminokyselin a peptidů (Strege, 1998), v posledních letech ale rychle roste počet nově vyvinutých nových kolon pro HILIC a aplikací pro separace v oblasti analýz životního prostředí, potravin, přírodních látek i syntetických léčiv, iontových i neiontových tenzidů. Významnou výhodou HILIC separací je zvýšená citlivost analýz pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí díky zlepšené ionizaci elektrospřejem (ESI) v mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu (Brown et al., 2002; Jandera, 2011).

Tohoto principu lze využít pro HILIC separaci steviol glykosidů s UV detekcí (Thermo, 2012). Při použití ELS detektoru (Evaporative Light Scattering) lze dosáhnout oproti detekci UV zlepšení meze detekce a kvantifikace. Nevýhodou tohoto detektoru je však nutná použití těkavé mobilní fáze.

I když v odborné literatuře již existuje řada metod pro stanovení rebaudiosidu A a ostatních steviol glykosidů, existuje jen málo potravinářských laboratoří, kde se tato metoda rutinně provádí. To se odráží v ceně této analýzy. Proto bylo cílem této práce vypracování analytické metody stanovení rebaudiosidu A (obr. 1) v pivu a limonádách pomocí dostupné techniky HPLC s UV detekcí s využitím separačního principu HILIC. Struktura rebaudiosidu A s převládajícími -OH skupinami svědčí o její vysoké polaritě. Pravděpodobná hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu mezi vodu a oktanol ($\log P$) je -3,12. Hodnoty menší než 1 charakterizují polární slou-

stevia could be used only in cosmetic industry although its safe use was known more than 1500 years. The position of the FDA was influenced by the misleading studies by the Brazilian Prof. Mauro Alvarez in 1988, which described stevia as having contraceptive properties and even causing infertility of men and women. A number of studies had to be performed to disprove this myth. Nearly 40 years thus elapsed before FDA approved stevia as a common sweetener without any contraceptive effect. None of the current studies has confirmed its effect on human fertility (Kumar et al., 2008).

Also in European Union extensive discussions and often mutually contradictory studies preceded the recognition of stevia as food supplement with designation E960.

Steviol glycosides were registered by EU as permitted sweetener only on December 2, 2011. This approval concerns rebaudioside A with the content of at least 90% of pure substance and mixtures of steviol glycosides with a total content higher than 95%.

According to the Joint Committee of Experts for Food Additives (JEFCA) of World Health Organization (WHO) and of Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) the acceptable daily intake of steviol glycosides is 4 mg of steviol per kg body mass a day (US Food and Drug Administration, 2008, JEFCA 2008). The sweetener rebaudioside A has found application in all branches of food industry as a non-calorific sweetener; it is used especially for sweetening of lemonades and syrups in beverage industry. Fruit beers sweetened with rebaudioside A have recently appeared increasingly often on the market. The slightly bitter taste of rebaudioside A harmonizes with the bitter beer character and it replaces more and more artificial sweeteners such as aspartam.

The widespread method for determination of steviol glycosides is HPLC, though there exist also some methods using thin layer chromatography, capillary electrophoresis or spectroscopic methods (NIR, VIS). The choice of HPLC separation conditions is dependent on the polar character of the glycosides, the choice of UV detection restricts the range of applicable absorbance to short wavelengths. An overview of earlier methods used for determination of steviol glycosides was written by Bovanová (1998). The HPLC methods describe a separation of steviol glycosides especially on columns with NH_2 or C18 functional groups; the mobile phases include mostly acetonitril or methanol with water in various ratios. Afandi et al (Afandi, 2013) described the optimization of conditions to obtain rebaudioside A from stevia leaves using Soxhlet extractor with subsequent HPLC determination on C18 column with mobile phase acetonitrile/water 80/20 (v/v). Bovanová et al. (Bovanová, 1998) published the preparation of liquid samples by SPE prior to HPLC analysis.

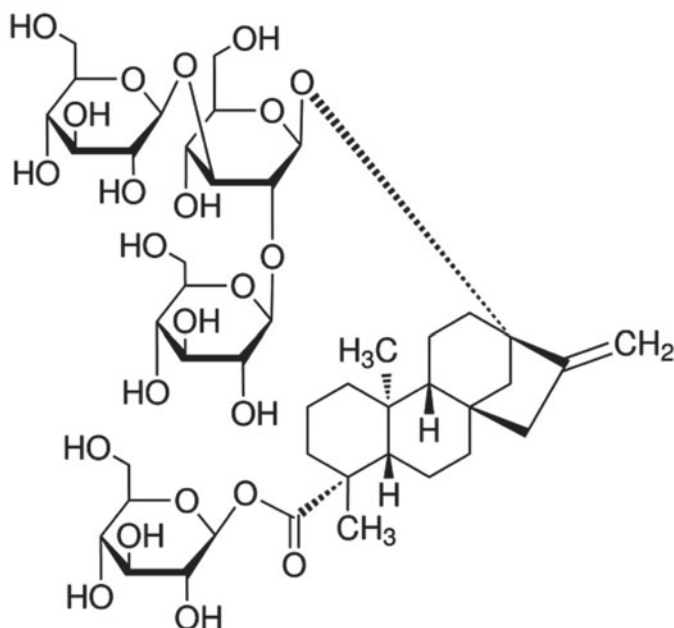
A new technique based on hydrophilic interactions in liquid chromatography (HILIC) is currently used to separate very polar and hydrophilic compounds. Alpert (Alpert, 1990) suggested term “chromatography of hydrophilic interactions” (HILIC) for chromatography on columns typical for systems with normal phases, which however are using water-organic mobile phases like the RP systems. The word “hydrophilic” characterizes the affinity to water added to mobile phases in HILIC separations on polar columns. The HILIC technique was first used for separation of saccharides, amino acids and peptides (Strege, 1998). However, the number of newly developed columns for HILIC and applications for separations in the area of environment, foods, natural compounds, synthetic drugs and nonionic surfactants has grown very quickly in the last years. An important benefit of HILIC separations is higher sensitivity of LC-MS analyses because of improved electrospray ionization (ESI) in mobile phases with high content of acetonitrile (Brown et al., 2002; Jandera, 2011).

This principle can be used for HILIC separation of steviol glycosides with UV detection (Thermo, 2012). Compared to UV detection, the use of ELS detector (evaporative light scattering) provides improvement of the limits of quantification and detection. The disadvantage of this detector is the necessity to use volatile mobile phase.

Though the relevant literature contains many methods for determination of rebaudioside A and other steviol glycosides, only a few food laboratories use this method routinely. This is reflected in the cost of this analysis. This study therefore aimed at setting up an analytical method for the determination of rebaudioside A (Fig. 1) in mixed beer and lemonade using an available HPLC technique with UV detection and HILIC separation principle.

The structure of rebaudioside A with prevailing -OH groups determines its high polarity. The probable value of logarithm of distribution coefficient between water and octanol ($\log P$) is -3.12. Values lower than 1 characterize the polar compounds (author's comment, see the Dictionary of Food Compounds on CD-ROM, 2004).

čeniny (poznámka autora, viz. Dictionary of Food Compounds with CD-ROM, 2004).



Obr. 1 Struktura rebaudiosidu A / Fig. 1 Structure of rebaudioside A

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a rozpouštědla

Rebaudiosid A, HPLC standard >96 % (Sigma-Aldrich).
Deionizovaná voda, obsah organických látek < 4 ppb (Millipore, USA)
Acetonitril, Chromasolv, gradient grade pro HPLC > 99,9 %, Sigma Aldrich
Methanol, Chromasolv, gradient grade pro HPLC > 99,9 %, Sigma Aldrich
Stříkačkové filtry celulosové s pórovitostí 0,2 µm (SISw, Praha).

2.2 Příprava vzorků

Vzhledem k vyšší koncentraci rebaudiosidu A v limonádách jsou tyto vzorky před analýzou pouze předčištěny. Vzorky piva s mnohem nižším obsahem sladidla je nezbytné také zakonzentrovat, a to tak, aby se měřené hodnoty pohybovaly v oblasti kalibrační křivky rebaudiosidu A. Pro čištění i zakonzentrování rebaudiosidu A byly použity extrakční kolonky C18, E 1000 mg/6 ml (Strata, Phenomenex, USA). Extrakční kolonka byla nejprve kondicionována (postupně 10 ml methanolu, 10 ml deionizované vody), poté byl na kolonku nanesen vzorek limonády (5 ml) nebo piva (25 ml). Zachycený vzorek na adsorbentu byl promyt (10 ml 20% acetonitrilu v deionizované vodě) a konečně eluován do směsi acetonitril – methanol v poměru 1:1 (v/v) o objemu 5 ml. Přechištěný vzorek byl po filtraci na celulosovém filtru (pórovitost 0,2 µm) nadávkován na kolonu (5 µl).

2.3 Příprava kalibračních roztoků

Rozsah kalibrační křivky byl zvolen tak, aby vyhovoval stanovení rebaudiosidu A jak v limonádách, tak v ochucených pivech s nižší koncentrací než 1 mg/l (takové vzorky jsou prekonzentrovány). Kalibrační roztoky byly připraveny rozpuštěním standardu do mobilní fáze. Zásobní roztok rebaudiosidu A byl připraven navážením 100 mg s přesností ± 1 mg standardu rebaudiosidu A a rozpuštěním ve 100 ml odměrce. Kalibrační roztoky o koncentracích 1, 5, 10, 20 a 50 mg/100 ml analytu byly připraveny ředěním příslušných objemů zásobního roztoku mobilní fázi.

2.4 HPLC stanovení

Pro stanovení rebaudiosidu A byla použita metoda kapalinové chromatografie s UV detekcí při 210 nm na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) vybaveným ovládacím a procesovacím softwarem Chromeleon 7.

Pro separaci polárního rebaudiosidu A od ostatních látek přítomných v maticích piva i limonády byla použita kolona Acclaim Mixed – Mode WAX 1(2,1 x 150 mm; 5 µm; Thermo Scientific) v HILIC modu.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals and solvents

Rebaudioside A, HPLC standard > 96% (Sigma – Aldrich)
Deionized water, content of organic compounds < 4 ppb (Millipore, USA)
Acetonitrile, Chromasolv, gradient grade, for HPLC > 99.9%, Sigma Aldrich
Methanol, Chromasolv, gradient grade, for HPLC > 99.9%, Sigma Aldrich
Syringe cellulosic filters 0.2 µm porosity (SISw, Prague).

2.2. Sample preparation

Samples of lemonades are only pre-purified before analysis in view of the higher concentration of rebaudioside A. Samples of mixed beer, with much lower content of the sweetener, must be pre-concentrated so that the measured values will fit into the range of the calibration curve of rebaudioside A. The extraction columns C18, E 1000 mg/6 ml (Strata, Phenomenex, USA) were used for purification and pre-concentration. The extraction column was first conditioned step by step with 10 ml of methanol, 10 ml of deionized water and after that a sample of lemonade (5 ml) or mixed beer (25 ml) was applied on the column. The sample captured on the adsorbent was washed (10 ml of 20% acetonitrile in deionized water) and eluted into 5 ml of the mixture of acetonitrile – methanol in a 1:1 (v/v) ratio. The purified sample was loaded on the column after filtration on cellulose filter.

2.3. Preparation of calibration solutions

The range of the calibration curve was chosen to comply with determination of rebaudioside A in both lemonades and in mixed beers with concentration lower than 1 mg/l (these samples were pre-concentrated). The calibration solutions were prepared by dissolving a standard in mobile phase. The stock solution of rebaudioside A was prepared by weighing 100 mg of rebaudioside A standard with accuracy ± 1 mg and its dissolution in 100 ml in graduated flask.

The other calibration levels of analyte, i.e. 1, 5, 10, 20 and 50 mg/100 ml were prepared by dissolving stock solution in appropriate volumes of mobile phase.

2.4. HPLC determination

HPLC with UV detection at 210 nm on Dionex Ultimate 3000 liquid chromatograph (Thermo Scientific) with Chromeleon 7 control and processing software was used for determination of rebaudioside A. The column Acclaim Mixed – Mode WAX 1 (2.1 x 150 mm; 5 µm; Thermo Scientific) in HILIC mode was used for separation of polar rebaudioside A from other compounds present in beer and lemonade matrices. The mobile phase consisted of acetonitrile and 10 mM ammonium formate at pH 3.00 ± 0.05 in a ratio of 80/20 (v/v) in isocratic mode. The flow rate of mobile phase was 0.5 ml/min, the column was temperature-controlled at 40 °C, and injection volume was 5 µl.

3 RESULTS AND DISCUSSION

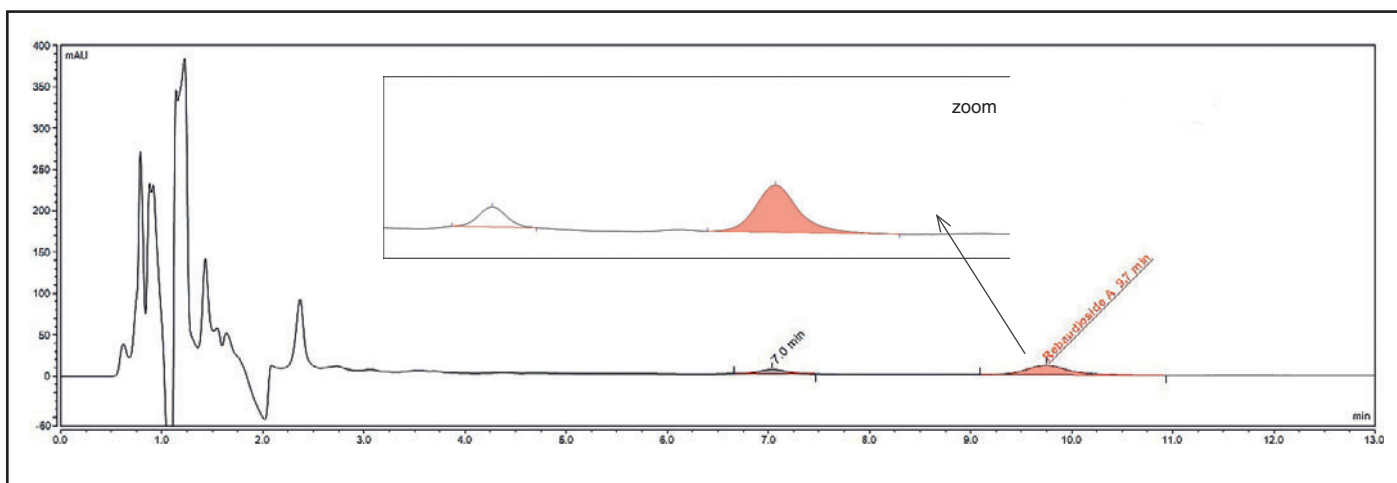
The method was optimized for mixed beer and lemonade matrices, and its validation involved verification of linearity, repeatability and recovery of the method.

3.1 Selectivity

As follows from Fig. 2, the elution zone of rebaudioside A is distinctly separated from other polar analytes even for its very low concentration in the sample. The last minority component elutes at 7.04 min while the elution zone of rebaudioside A is at 7.95 min. The total separation of rebaudioside A from other components complies with the requirements for a good selectivity of the method. This is given by the use of HILIC mode which has a markedly better selectivity to polar compounds and thus to rebaudioside A than the usual non-polar columns. Another advantage of the HILIC mode is a higher sensitivity; it is 10 – 1000-fold higher for hydrophilic analytes than reverse mode techniques.

3.2 Linearity

The linearity was verified in a calibration range of 1-50 mg/l where the detector response of rebaudioside A has clearly a linear dependence. It is evident from table 1 that the concentrations of rebaudioside A in the original mixed beer appear in the close proximity of the lower point of the calibration curve.



Obr. 2 Chromatogram separace vzorku piva obsahující rebaudiosid A / Fig. 2 Chromatogram of separation of beer sample containing rebaudioside A

Kolona Acclaim Mixed – Mode WAX 1 (2,1 x 150 mm; 5 µm), mobilní fáze acetonitril a 10 mM mravenčan amonný 80/20 (v/v) v izokratickém režimu. Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, teplota kolony 40 °C, nástřik vzorku 5 µl. Retenční čas rebaudiosidu A 9,75 min / Column Acclaim Mixed – Mode WAX 1 (2.1 x 150 mm; 5 µm), mobile phase acetonitrile and 10 mM ammonium formate 80/20 (v/v) in isocratic mode. Flow rate of mobile phase 0.5 ml/min, temperature of column 40 °C, injection volume 5 µl. The retention time of rebaudioside A is 9.75 min

Mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a 10 mM mravenčanem amonným o pH 3,00 ± 0,05 v poměru 80/20 (v/v) v izokratickém režimu. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, kolona byla termostatována při 40 °C, nástřik vzorku byl 5 µl.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Metoda byla optimalizována pro matrice pivo a limonády, v rámci validace byla ověřována linearita metody, její opakovatelnost a výtěžnost.

3.1 Selektivita

Jak vyplývá z obr. 2, eluční zóna rebaudiosidu A je zřetelně oddělena od ostatních polárních analytů, a to i v případě velmi nízké koncentrace ve vzorku. Poslední minoritní složka eluuje v čase 7,04 min, eluční zóna rebaudiosidu A až v čase 9,75 min. Úplná separace rebaudiosidu A od ostatních složek vyhovuje podmínkám dobré selektivity metody. Tato skutečnost je dána použitým HILIC módem, která má výrazně lepší selektivitu k polárním látkám, a tedy rebaudiosidu A, ve srovnání s běžnými nepolárními kolonami. Další výhodou HILIC módu je vyšší citlivost, neboť pro hydrofilní analyty je ve srovnání s reversními technikami 10 až 1000 x vyšší.

3.2 Linearita

Linearita byla ověřena v uvedeném kalibračním rozsahu 1 – 50 mg/100 ml, kde má prokazatelně odezva detektoru lineární závislost na koncentraci rebaudiosidu A.

Z tab. 1 je zřejmé, že hodnoty koncentrace rebaudiosidu A se v původním vzorku ochuceného piva pohybují v těsné blízkosti spodního bodu kalibrační závislosti.

3.3 Opakovatelnost a výtěžnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti a výtěžnosti metody byla použita limonáda typu Cola a pivo ochucené ovocným výtažkem, obojí s deklarovaným obsahem rebaudiosidu A. U obou vzorků byla stanovena koncentrace sledovaného analytu. Každý vzorek byl extrahován

3.3 Repeatability and recovery of the method

A Cola-type lemonade and mixed beer flavored with fruit extract, both with the stated content of rebaudioside A, were used for determination of repeatability and recovery of the method. The concentration of the monitored analyte was determined for both samples. Each sample was extracted on a SPE column and subsequently analyzed on a chromatographic column. The determined content of rebaudioside A in each sample and repeatability (expressed as a limit of repeatability) are given in Table 1. The permissible difference between two parallel determinations (limit of repeatability) in both the beer and the lemonade is 0.42 mg/100 ml, which attests to the good precision of the method.

The repeatability of the method was determined using standard addition of rebaudioside A to samples of mixed beer and lemonade. Two distinct concentrations of the standard were prepared to eliminate mistakes in the dosage of different volumes of standard added into the beer and the lemonade. A solution having the concentration of 1000 mg/100 ml water was prepared for spiking of lemonade while a solution of 100 mg/100 ml water was prepared for spiking beer. The standard was added into 100 ml volumetric flasks to achieve two different concentrations. With both matrices, an adequate volume of the standard was filled up to the graduation mark.

The dosage of 1 ml or 2 ml of standard solution into lemonade caused an increase of the analyte concentration to about 10 resp. 20 mg/100 ml. The dosage of 2 ml resp. 4 ml of standard solution into beer signified the increasing the concentration of analyte by about 2 or 4 mg/100 ml. Every concentration level was determined twice. The results are given in Table 2. The recovery of the method for lemonades and mixed beer ranges in the interval from 101.9% to 102.8% and from 90.2% to 93.1%, respectively. This fact is apparently caused by larger matrix effect in beer and by pre-concentration of beer before analysis. Due to the solubility of the analyte in alcohol its partial leak occurs during of sorption and washing of SPE column.

The HILIC technique permits the separation of rebaudioside A from other polar compounds also in the very complicated beer matrix, which would not be possible using conventional polar column due to the high polarity of rebaudioside A. The elimination of co-elution

Tab. 1 Opakovatelnost metody / Table 1 Repeatability of the method

	1	2	3	4	5	průměr / average	s*	r**
LIMONÁDA / LEMONADE (mg / 100 ml)	6.41	6.58	6.67	6.80	6.52	6.59	0.15	0.42
OCHUCENÉ PIVO / MIXED BEER (mg/100 ml)	1.92	1.98	1.78	1.67	1.65	1.80	0.15	0.42

*směrodatná odchylka / standard deviation, ** opakovatelnost / repeatability

na SPE kolonce a následně analyzován na chromatografické koloně. Stanovení obsah rebaudiosidu A v každém vzorku a opakovanost stanovení (vyjádřená jako mez opakovatelnosti) jsou uvedeny v tab. 1. Přípustný rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními (mez opakovatelnosti) v případě piva i limonády v původním vzorku činí 0,42 mg/100 ml, což vypovídá o dobré přesnosti metody.

Výtěžnost metody byla zjišťována pomocí standardního přídatku rebaudiosidu A. Ke vzorku limonády a ochuceného piva byl přidán standard rebaudiosidu A o dvou různých koncentracích a z rozdílu před a po přidání byla vypočtena výtěžnost metody. Aby byly eliminovány chyby, které by vznikly dávkováním řádově odlišných objemů při přidavku do ochuceného piva a limonády, byly připraveny standardní roztoky odlišných koncentrací: pro limonádu byl připraven roztok o koncentraci 1000 mg/100 ml, pro pivo o koncentraci 100 mg/100 ml. V obou případech byl přidán standardní přídatek tak, aby se dosáhlo dvou odlišných koncentračních úrovní. Do 100 ml odměrné baňky byl vždy přidán odpovídající objem standardního roztoku a doplněn příslušnou maticí po značku. Do limonády byly dávkovány 1 ml resp. 2 ml standardního roztoku, což znamenalo zvýšení koncentrace analytu v limonádě o 10 resp. 20 mg/100 ml, do piva byly přidány 2 ml resp. 4 ml standardního roztoku, což znamenalo zvýšení koncentrace analytu v matici piva o 2 resp. 4 mg/100 ml. Na každé koncentrační úrovni bylo stanovení provedeno 2x. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2. Výtěžnost metody se pro limonády pohybuje v intervalu 101,9 % až 102,8 %, pro piva mezi 90,2 % až 93,1 %. Tento fakt je zřejmě způsoben větším maticím efektem v pivu a zakoncentrováním piva před analýzou, vzhledem k rozpustnosti tohoto analytu v alkoholu dochází při sorpci a promývání na SPE kolonku k jeho částečnému úniku.

Applikace HILIC techniky umožňuje selektivně oddělit rebaudiosid A od ostatních polárních látek i z velmi komplikované matrice piva, což by vzhledem k vysoké polaritě rebaudiosidu A nebylo možné dosáhnout pomocí běžných polárních chromatografických kolon. Eliminace koeluce rebaudiosidu A s jinými složkami vzorku zabezpečuje správnost stanovení bez nadhodnocení výsledku. Ostatní analytické parametry jsou ve shodě s publikovanými metodami s UV detekcí v oblasti krátkých vlnových délek.

4 ZÁVĚR

Vypracovaná metoda pro stanovení rebaudiosidu A poskytuje dostatečně přesné (opakovanost 0,42 mg/100 ml) a správné (výtěžnost 90 až 100 %) výsledky. Rozpustnost rebaudiosidu A v alkoholu vysvětluje posun rovnováhy na extrakční kolonce, a tak i nižší výtěžnost z piva ve srovnání s nealkoholickou limonádou. Koncentrace rebaudiosidu A v běžných vzorcích piva a limonády po úpravě na SPE kolonce vyhovují lineární kalibrační závislosti v oblasti od 1 do 50 mg/100 ml analytu.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována za podpory MZE-RO1014 Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin.

of rebaudioside A with other polar compounds assures the accuracy of determination without overrating of the results. All other analytical parameters are in the agreement with the results of other published methods with UV detection in the range of short wavelengths.

4 CONCLUSION

The newly developed method to determination of rebaudioside A shows satisfactory precision (repeatability 0.42 mg/100 ml) and accuracy (recovery 90–100%). The solubility of rebaudioside A in alcohol explains the equilibrium shift on extraction column, and thus also a lower recovery from beer in comparison to non-alcoholic lemonade. The concentration of rebaudioside A in mixed beer (or a beer-based beverage) and lemonade after its treatment on the SPE column complies with a linear calibration relationship in the range from 1 to 50 mg/100 ml of the analyte.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the project MZE-RO1014 "Research of the quality and processing of malting and brewing raw materials" of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

LITERATURA / REFERENCES

- Afandi, A., Sarijan, S., Shaha, R. K., 2013: Optimization of rebaudioside a extraction from Stevia Rebaudiana (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*, 1: 62–70.
- Alpert, A. J., 1990: New Approaches for Analysis of Metabolism Compounds in Hydrophilic Interaction Chromatography *J. Chromatogr.*, 449: 177–196. DOI:10.1080/10826070701435111
- Bovanová, L., Brandšteterová, E., Baxa, S., 1998: HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. *Z Lebensm Unters Forsch A.*, 207: 352–355.
- Brown, S. D., White, C. A., Bartlett, M. G.: 2002: Hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray mass spectrometry determination of acyclovir in pregnant rat plasma and tissues *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16: 1871–1876. DOI: 10.1002/rcm.792
- Dictionary of Food Compounds with CD – ROM: Additives, Flavors, and Ingredients. Edited by Shmuel Yannai, 2004 by Chapman & Hall/CRC.
- Jandera, P., 2011: Hilic chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemmagazín*, XXI(2)
- Kumar, R. D., Oommen, O. V., 2008: Stevia Rebaudiana Bertoni does not produce female reproductive toxic effect: Study in Swiss albino mouse. *J. Endocrinol Reprod.*, 12: 57–60.
- Prakash, I., Du Bois, G. E., Clos, J. F., Wilkens, K. L., Fosdick, L. E., 2008: Development of Rebiana, a Natural, Noncaloric Sweetener. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 75–82. DOI:10.1016/j.fct.2008.05.004
- Steviol Glycosides Prepared at the 69th JEFCA (2008); in *FAO JEFCA Monographs*, 5, 2008.
- Strege, M. A., 1998: Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Anal. Chem.*, 70, 2439–2445. DOI: 10.1021/ac9802271
- Thermo Scientific: 2012, Determination of Steviol Glycosides by HPLC with UV and ELS Detection. Application Note 241.

Do redakce došlo: 26. 6. 2015
Přijato k publikování: 29. 7. 2015

Tab. 2 Výtěžnost metody / Table 2 Recovery of the method

Matrice / Matrix	Původní koncentrace rebaudiosidu A / Original concentration of rebaudioside A (mg/100ml)	Přídavek rebaudiosidu A / Spike of rebaudioside A (g/100ml)	Koncentrace po standardním přídatku / Concentration after spike (mg/100ml)*	Výtěžnost / Recovery (%)
LIMONÁDA / LEMONADE				
přídavek 1/ spike 1	6.6	10	16.8	101.9
přídavek 2/ spike 2	6.6	20	27.2	102.8
OCHUCENÉ PIVO / MIXED BEER				
přídavek 1/ spike 1	1.8	2	3.7	93.1
přídavek 2/ spike 2	1.8	4	5.4	90.2

*průměr ze dvou stanovení / average of two determinations