

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

HANA MÍLOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Náhradní sladidla a jejich vliv na zdraví člověka
Hana Mílová

Bakalářská práce
2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana Mílová**
Osobní číslo: **C15331**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Náhradní sladidla a jejich vliv na zdraví člověka**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování:

1. Definujte náhradní sladidla a jejich podmínky použití v potravinách podle platné legislativy, zaměřte se jen na vybrané sloučeniny.
2. S využitím informací EFSA a odborných zahraničních periodik popište vliv vybraných náhradních sladidel na zdraví člověka. Doplněte souhrnné zprávy EFSA o nejnovější vědecké poznatky.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2018

Hana Mílová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D. za rady, pomoc a velmi vstřícný přístup při vypracovávání bakalářské práce.

Mé poděkování patří též rodině, příteli a přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato práce je literární rešerší zabývající se náhradními sladidly, jejich rozdělením, vlastnostmi a zdravotními riziky, která jsou diskutovaným tématem. Konkrétně je práce zaměřena na aspartam, sukralózu a steviol-glykosidy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aspartam, sukralóza, steviol-glykosidy, sladidla, zdraví člověka

TITLE

Artificial sweeteners and their effect on human health

ANNOTATION

This bachelor thesis is in the form of literary research dealing with sweeteners, their distribution, properties and health risk for human health. This thesis is focused on aspartame, sucralose and steviol-glycosides.

KEYWORDS

Sweeteners, aspartame, sucralose, steviol-glycosides, human health

OBSAH

ÚVOD	12
1 NÁHRADNÍ SLADIDLA	13
1.1 OBECNÉ INFORMACE	13
1.2 Rozdělení a vlastnosti sladidel	14
2 ASPARTAM (E951)	17
2.1 Obecné informace	17
2.2 Historie	17
2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti	18
2.4 Výroba	20
2.5 Analytické stanovení	20
2.6 Absorbce, distribuce a metabolismus vylučování aspartamu	20
2.7 Zdravotní rizika aspartamu	21
2.7.1 Genotoxicita a mutagenita	22
2.7.2 Karcinogenita.....	23
2.7.3 Studie vlivu na vývoj.....	25
2.7.4 Studie vlivu na reprodukční toxicitu.....	26
2.7.5 Expozice aspartamu a jeho derivátům	27
2.7.6 Akutní toxicita aspartamu	28
2.7.7 Krátkodobá a subchronická toxicita	28
2.8 Epidemiologické studie u lidí	30
2.8.1 Studie konzumace aspartamu a předčasného porodu	30
2.8.2 Studie zabývající se souvislostí mezi konzumací aspartamu a bolestí hlavy.....	32
2.8.3 Studie karcinogenity.....	32
3 SUKRALÓZA (E 955)	33
3.1 Obecné informace	33
3.2 Historie	33
3.3 Výroba sukralózy	34
3.4 Organoleptické vlastnosti	34

3.5	Použití	35
3.6	Fyzikálně-chemické vlastnosti	36
3.7	Absorpce, vylučování a metabolismus	38
3.8	Analytické stanovení	39
3.9	Bezpečnost sukralózy	39
3.9.1	Neurotoxická	40
3.9.2	Akutní toxicita	40
3.9.3	Dlouhodobá toxicita, genotoxicita, teratogenita	41
3.9.4	Karcinogenita	41
3.9.5	Vliv na reprodukci a vývoj	41
4	STEVIOL-GLYKOSIDY (E 960)	43
4.1	Obecné informace:	43
4.2	Rostlina	45
4.3	Obsahované látky:	45
4.4	Výroba	46
4.5	Analytické stanovení:	46
4.6	Fyzikálně-chemické vlastnosti	46
4.7	Absorpce, distribuce a metabolismus	48
4.8	Zdravotní rizika	49
4.8.1	Akutní toxicita	49
4.8.2	Krátkodobá a subchronická toxicita	49
4.8.3	Genotoxicita	50
4.8.4	Karcinogenita	50
4.8.5	Reprodukční toxicita	51
4.8.6	Alergeničita	51
4.9	Pozitivní vliv na zdraví	52
5	ZÁVĚR	53
6	CITOVANÁ LITERATURA	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Hodnoty ADI a sladivosti [7].....	15
Tabulka 2 - Zařazení sladidel do skupin [1]	16
Tabulka 3 - Fyzikálně-chemické vlastnosti aspartamu [8].....	18
Tabulka 4 - Výskyt nádorů [21].....	24
Tabulka 5 - Fyzikálně-chemické vlastnosti sukralózy [36].....	37
Tabulka 6 - Přehled steviol- glykosidů, vlastnosti steviol-glykosidů [47].....	44
Tabulka 7 - Fyzikálně-chemické vlastnosti rebaudiosidu A [53; 54]	47

SEZNAM OBRAZKŮ

Obrázek 1 - Strukturní vzorec aspartamu (vlastní zpracování)	17
Obrázek 2 – Histologické barvení jaterních buněk, světelný mikroskop [27]	30
Obrázek 3 - Strukturní vzorec sukralózy (vlastní zpracování)	33
Obrázek 4 - Strukturní vzorec rebaudiosidu A (vlastní zpracování).....	43
Obrázek 5 - Strukturní vzorec steviosidu (vlastní zpracování).....	44
Obrázek 6 - <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, práškové sladidlo Stevie [50]	45

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADI	Akceptovatelný denní příjem
AFC	Vědecká komise pro potravinářské přídatné látky, aromatické látky, pomocné látky a materiály pro potraviny
AFSSA	Francouzský úřad pro bezpečnost potravin
ALT	Alaninaminotransferáza
AST	Aspartátaminotransferáza
BMI	Index tělesné hmotnosti
CG	Chlorgalaktóza
DCF	Dichlorfruktóza
DKP	Diketopiperazin
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GI	Gastrointestinální
GSH	Glutathion
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
JECFA	Mezinárodní výbor pro potravinářské přídatné látky, který je spravován Organizací spojených národů pro výživu a zemědělství a Světovou zdravotnickou organizací
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LD50	Letální dávka, po které zemře 50 % testovaných živočichů
LOD	Smrtelné předávkování
NAC	N-acetylcystein
NOAEL	Dávka, při které ještě nebyl pozorován škodlivý účinek
ppm	Částic na jeden milion
RI	Refraktometrický detektor
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních adsorbentech
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UHT	Vysokoteplotní úprava
UV	Ultrafialové záření

ÚVOD

Tato práce pojednává o umělých sladidlech, což je v dnešní době velmi diskutované téma. Vzhledem ke stoupajícímu povědomí o velkém obsahu cukru v mnoha potravinách, narůstající obezitě populace či výskytu diabetu, jsou umělá sladidla stále více využívána. Cílem práce bylo získat informace o zdravotních rizicích daných sladidel z veřejně dostupných informací EFSA a doplnit je o novější studie či poznatky. Konkrétně tato práce pojednává o třech hojně používaných sladidlech, a to jmenovitě aspartamu, sukralóze a steviolglykosidech.

Nejprve jsou v práci definována a popsána sladidla obecně, jejich použití, značení a legislativa. Dále jsou v práci sladidla rozdělena do skupin dle původu či potencionálního rizika. Ke každému sladidlu jsou uvedeny základní vlastnosti, analytické stanovení, použití a zdravotní rizika, pro která byla daná sladidla testována. Dále je v textu zmíněno vstřebávání či metabolismus jednotlivých sladidel, ze kterého je poté možné uvážit další rizika. Například zda tvoří sloučeniny, které by mohly být potencionálním rizikem, či jiné vlastnosti, které by mohly mít vliv na zdraví člověka.

K informacím EFSA jsem se snažila dohledat informace z novějších zdrojů, které by potvrdily či vyvrátily závěry uvedené v těchto článcích. Hlavním zdrojem pro novější studie byly internetové články. Obecné informace o sladidlech byly čerpány z odborné literatury.

Dané téma jsem si zvolila, protože umělá sladidla sama používám a zajímá mě jejich vliv na zdraví.

1 NÁHRADNÍ SLADIDLA

1.1 OBECNÉ INFORMACE

Umělá sladidla patří do skupiny přídatných látek (tzv. aditiv), nesprávně označovaných jako konzervanty. Tyto látky se přidávají do potravin za účelem vylepšení chuti, vylepšení či zachování trvanlivosti, vůně, chutě, konzistence atd. Kromě sladidel se do této skupiny látek řadí barviva, antioxidanty, konzervanty, regulátory kyselosti, kypřící látky, látky zvýrazňující chuť a vůni, tavící soli, zahušťovadla, želírující látky, modifikované škroby, stabilizátory, emulgátory, nosiče a rozpouštěla, protispékavé látky, lešticí látky, balící plyny, propelanty, odpěňovače, pěnotvorné látky, zvlhčující látky, plnidla, zpevňující látky, sekvestranty, látky zlepšující mouku [1].

V České republice upravuje druhy a použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, v aktuálním znění [2]. Pro jednotlivé látky jsou stanoveny limitní hodnoty tzv. „nejvyšší povolené množství“. Pro některé látky nemusí být stanoveny nejvyšší povolené množství, v takovém případě se může do potravin přidávat pouze „nezbytně nutné množství“. V polotovarech je možné použít pouze takové látky, které je povoleno používat ve finálním výrobku [1].

Pro přehlednost je zaveden mezinárodní číselný systém, kde je každá přídatná látka vedena pod symbolem E a trojmístným či čtyřmístným číslem. Pokud je látka vedena v tomto systému, znamená to, že prošla hodnocením bezpečnosti a byla schválena Vědeckým výborem pro potraviny EU. Pokud má látka kód E, nemusí být povolena v České republice, ačkoliv vstupem do EU došlo ke značnému rozšíření povolených aditiv v České republice, a to díky sloučení právních předpisů ČR s legislativou EU [1]. Platným právním předpisem EU je nařízení parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách [3].

Náhradní sladidla patří do skupiny látek, které dávají potravinám sladkou chuť, ale nejsou řazeny mezi monosacharidy a disacharidy. Přesná definice není v aktuální vyhlášce přímo napsána, ale obsahovala ji dříve platná vyhláška č. 304/2004, kterou nahradila nynější vyhláška 4/2008 v aktuálním znění [4]. V původní vyhlášce byla sladidla definována jako „látky, které udělují potravinám sladkou chuť a nahrazují přírodní sladidla a med“ [1].

Pro použití sladidel je také důležité vědět, jaká je jejich tepelná stabilita a sladivost. Některá sladidla jsou stabilní jen při nižších teplotách (např. aspartam) a poté se rozkládají

na jednotlivé složky či z nich vznikají jiné látky, které mohou být toxické. Výhodné je také používat směsi sladidel, které mívají větší sladivost než jednotlivá sladidla (tzv. synergický efekt) a jsou tak ekonomicky výhodnější. Směsi také mívají menší pachut', nežli jednotlivá sladidla a jejich chuť se tak více podobá chuti cukru [1].

Pokud výrobek obsahuje alespoň 10 % sladidel, které jsou řazeny do cukerných alkoholů (např. sorbitol, mannitol, isomalt, maltitol, atd.), musí být označeny upozorněním: „Nadměrná konzumace může vyvolat projímavé účinky“ [1]. U sladidel, která obsahují aspartam nebo sůl aspartamu-acesulfamu, musí mít na obale napsáno, že jsou zdrojem fenylalaninu. Upozornění o zdroji fenylalaninu je velmi důležité pro osoby trpící fenylketonurií, protože tuto aminokyselinu nedokáží zpracovávat. Konzumace potravin, které spadají do této kategorie, může těmto osobám způsobovat různě závažné zdravotní komplikace [1].

1.2 Rozdělení a vlastnosti sladidel

Za základní rozdělení sladidel můžeme považovat následující [5]:

- Přírodní (např. thaumatin, steviosid)
- Syntetické látky identické s přírodními (cukerné alkoholy) nebo modifikované přírodní látky (neodesperidindihydrochalkon)
- Syntetické (acesulfam K, sacharin)
- Výživová (cukerné alkoholy)
- Nevýživová (prakticky všechny ostatní přírodní, modifikované přírodní a syntetické látky)

Rozdělení na výživová a nevýživová sladidla souvisí i se sladivostí jednotlivých sladidel. Výživová mají často podobnou sladivost jako sacharóza, naopak nevýživová mají sladivost až stonásobně vyšší. Mezi nevýživová patří například sacharin (E 954), cyklamáty (E 952), aspartam (E 951), či Acesulfam K (E 950). Mezi výživová patří například xylitol (E 967), sorbitol (E 420). Syntetická nevýživová sladidla nejsou původcem zubního kazu a jsou vhodná pro diabetik [5].

Pro každé sladidlo, stejně jako pro každou schválenou a povolenou aditivní látku, se určuje hodnota NOAEL, což je koncentrace látky, u které nejsou pozorovány žádné nepříznivé vlivy na organismus. Tuto hodnotu je poté nutné vydělit bezpečnostním faktorem, který je obvykle 100 a dostaneme hodnotu ADI (acceptable daily intake). ADI je přijatelná denní dávka čili množství, které může být konzumováno denně po celý život bez negativního dopadu na zdraví člověka. Obvykle se vyjadřuje v mg/kg tělesné hmotnosti. ADI nepředstavuje hladinu

toxicity, ale hladinu bezpečného příjmu určité látky. V následující tabulce jsou uvedeny některé hodnoty ADI a sladivost jednotlivých sladidel [6].

Tabulka 1 - Hodnoty ADI a sladivosti [7]

Název sladidla	Hodnota ADI (mg/kg váhy a den)	Sladivost (sacharóza = 1)
Acesulfam K	15	200x
Aspartam	50	200x
Sacharin	15	200-700x
Steviol glykosidy	4	200-400x
Sukralóza	5	600x
Cyklamáty	7 (dle JECFA)	30-60x

Zdravotní nezávadnost či závadnost potravin je často diskutována, ale závěry se často rozcházejí. Často bývají sladidla (či obecně aditivní látky) rozdělována podle rizikovosti do několika skupin, dle zdroje [1] následovně:

- Aditiva, která nezpůsobují žádné zdravotní problémy
- Aditiva méně vhodná, jejichž používání je sporné
- Aditiva nevhodná

Aditiva, která nezpůsobují žádné zdravotní problémy, mohou dokonce působit pozitivně na organismus. Jsou to látky přírodního původu, které jsou získávány z přírodních zdrojů nebo jsou přírodně identické, což znamená, že jsou vyrobené takovým způsobem, že jejich chemická struktura je stejná jako struktura přírodní látky. Do této skupiny dle tohoto zdroje nepatří žádné sladidlo [1]. Do této skupiny by mohly být zařazeny steviol-glykosidy, jejichž pozitivní účinky jsou zmíněny dále v této práci.

Druhá skupina čili aditiva méně vhodná, obsahuje látky, které jsou podezřelé z negativního dopadu na zdraví, zejména při nadměrné či vysoké konzumaci. Tyto látky by neměli konzumovat děti a osoby citlivé na více druhů potravin. Do této skupiny již jsou zařazena sladidla, a to například sorbitol (E 420), mannitol (E 421), isomalt (E 953), maltitol (E 965), xylitol (E 967) [1].

Do třetí skupiny jsou řazeny aditiva, která jsou nevhodná, zejména kvůli vzniku přecitlivělosti či intolerance. Patří sem zejména látky, které jsou syntetického původu a látky, u kterých byla prokázána toxicita. Ze sladidel sem patří například acesulfam K (E 950),

aspartam (E 951), sacharin a jeho soli (E 954). Pro přehlednost je zde tabulka, kde jsou uvedena jednotlivá sladidla ve skupinách. Zdravotní rizika tři vybraných sladidel budou v práci dále podrobněji specifikována [1].

Tabulka 2 - Zařazení sladidel do skupin [1]

Sladidla, která nezpůsobují žádné zdravotní komplikace	
Sladidla méně vhodná, jejichž užívání je sporné	E 420 Sorbitol
	E 421 Mannitol
	E 953 Isomalt
	E 965 Maltitol
	E 967 Xylitol
Sladidla nevhodná	E 950 Acesulfam K
	E 951 Aspartam
	E 954 Sacharin

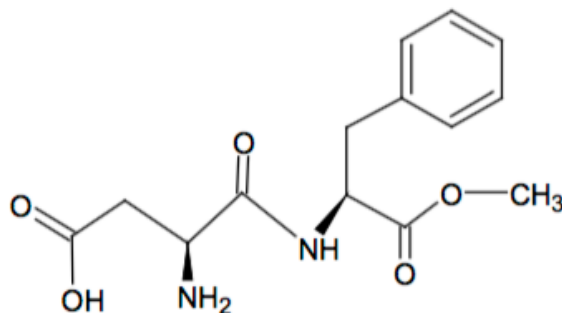
2 ASPARTAM (E951)

2.1 Obecné informace

Sumární vzorec: C₁₄H₂₈N₂O₅

Molekulová hmotnost: 294,31 g/mol

CAS číslo: 22839-47-0 [8]



Obrázek 1 - Strukturální vzorec aspartamu (vlastní zpracování)

Aspartam je methylester dipeptidu L-aspartyl-L-fenylalaninu. Je to bílý, krystalický prášek bez zápachu. Nemá žádné vedlejší pachuti a v nevodném prostředí (například ve žvýkačkách, instantní kávě) je stabilní [9].

2.2 Historie

Aspartam byl objeven v roce 1965 jako vedlejší produkt při syntéze léků proti vředům vědcem Jamesem M. Schlatterem. Jeho sladkou chuť objevil po olíznutí kontaminovaného prstu, kterým chtěl otočit papír [10]. Poprvé byl aspartam jako umělé sladidlo schválen společností FDA (Food and Drug Administration) v roce 1981 a byla schválena ADI v dávce 50 mg/kg. Již v roce 1996 byla publikována zpráva naznačující spojení mezi aspartamem a zvýšením výskytu nádorů mozku v USA. Toto tvrzení ale nebylo podloženo a v roce 1997 byla tato skutečnost posouzena a nepotvrzena britským Výborem pro karcinogenitu chemických látek v potravinách, spotřebních výrobcích a životním prostředí. Ani analýza Národního onkologického institutu o výskytu rakoviny v USA nepodporovala souvislost mezi užíváním aspartamu a zvýšeným výskytem nádorů mozku. Zdravotní rizika budou podrobněji sepsána v následující části práce [9].

2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Při alkalickém pH uvolňuje aspartam methanol a tvoří α -aspartylfenylalanin nebo se zacyklí a vzniká diketopiperazin (DKP). Konverze aspartamu na DKP či α -aspartylfenylalanin vede ke ztrátě sladké chuti. Při kyselém pH pod 4,5 se kromě dvou hlavních reakčních cest, které se vyskytují při alkalickém pH, může objevit i strukturální přesmyk za vzniku β -aspartamu. Dále může být štěpena peptidová vazba, čímž vznikne methylester L-fenylalaninu a L-asparagová kyselina. Nakonec může být i α -aspartylfenylalanin hydrolyzován na jednotlivé aminokyseliny [9].

Tabulka 3 - Fyzikálně-chemické vlastnosti aspartamu [8]

Fyzikální struktura	Bílý krystalický prášek
Zápach	Bez zápachu
Chuť	Intenzivně sladká
Sladivost	200x vyšší než sacharóza
Kalorická hodnota	Nulová
Rozpustnost	Rozpustnost ve vodě při pH 2,2 (20 mg/ml roztoku při 25 °C), rozpustnost při pH 5,2 (13,5 mg/ml roztoku při 25 °C), prakticky nerozpustný v oleji
Specifická otáčivost	$[\alpha]_{20}^D +14,5^{\circ}-16,5$
Rozdělovací koeficient oktanol/voda	0,85 (20 °C)
Bod tání	190 °C a 245–247 °C
Molekulová hmotnost	294,307 g/mol

Stabilita čistého aspartamu v tuhém stavu je minimálně pět let, a to za předpokladu, že je skladován v prostředí o vlhkosti menší než 8 %. Studie, které se zabývaly stabilitou ukázaly, že při teplotách skladování vyšších než 80 °C dochází k zacyklení za uvolnění methanolu a vzniká DKP. Ve zcela suchých prostředích je přeměna aspartamu na DKP velmi pomalá (5 % za 100 hodin při 105 °C). Za zvyšování teploty dochází i k rychlejší konverzi (50 % za 80 hodin při 120 °C a 100 % za 30 hodin při 150 °C). Pokud dochází k zahřívání na 110 °C ve vakuu, v okyseleném prostředí a ve vysušeném stavu po dobu 24 hodin, může aspartam dehydratovat za vzniku anhydridu [11].

V roztocích má aspartam omezenou stabilitu, v závislosti na pH, teplotě a čase. Rozsáhlé studie kinetiky rozkladu aspartamu v roztoku ukázaly, že degradace probíhá podle kinetiky

prvního řádu. Ve vodných prostředích je nejstabilnější při pH 4–5 a při 25 °C má aspartam poločas rozpadu více jak 250 dní. Poločas rozpadu je čas, za který klesne koncentrace dané látky na polovinu. Pokud dojde ke snížení pH na 3, poločas rozpadu se zkrátí na 100-125 dní, při pH 1 je poločas rozpadu již pouhých 25 dní. Pokud naopak pH zvýšíme na 6, poločas rozpadu se sníží na 50-100 dní a při zvýšení na pH 7 klesne pod 25 dní. Hlavním degradačním produktem při pH 2-6 byl methylester L-fenylalaninu, v rozmezí pH 7-10 byl hlavním produktem rozkladu již zmiňovaný DKP a při pH 12 L-aspartylfenylalanin. Ve vodném prostředí může aspartam reagovat s redukujícími cukry, a to formou Maillardovy reakce. Mezikrok Maillardovy reakce-Shiffova báze byl též zaznamenán při reakci aspartamu a vanilinu v roztoku methanolu a vody [11].

Průběh hydrolyzy se zrychluje zvýšením teploty, mikrovlnným zářením a s časem. Elektrotermální hydrolyzou při teplotě 120 °C po dobu jednoho dne vzniká jak kyselina D-asparagová, tak D-fenylalanin. Při teplotě 90 °C po dobu 2-3 dní lze pozorovat pouze kyselinu D-asparagovou. Pro mikrovlnnou hydrolyzu byla detekována pouze kyselina L-asparagová, a to při výkonu 56 W po dobu jedné minuty nebo při 320 W po dobu tří minut [12].

V nápojích s limetkovou či citrónovou šťávou, uchovávaných při 22 °C, byl zjištěn pokles obsahu aspartamu, a to na 28-37 % po 6 měsících a na 4-6 % po 36 měsících. K degradaci dochází také v čerstvých šťávách a jejich roztocích určitých druhů ovoce jako jsou kiwi, ananas, papája a meloun, pravděpodobně působením proteolytických enzymů. Jogurtové kultury (kmeny *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*) degradují aspartam během fermentace, degradace byla nejvyšší při růstu kultury a stala se zanedbatelnou poté, co pH jogurtu kleslo pod 5 a kultura dosáhla stacionární fáze [9; 12].

Koncentrace DKP, aspartylfenylalaninu a fenylalaninu byla analyzována z degradace aspartamu ve 24 různých komerčních potravinách. Rozklad byl vysoký v ovocném krému (40 %), mléčné čokoládě (26 %), sladovém nápoji (22 %) a ovocném jogurtu (15 %). Dále bylo zjištěno, že až 21 % aspartamu v kolovém nápoji a 12 % v ovocném krému je ve formě DKP. Degradace na DKP závisí na teplotě skladování. Pokud je nápoj skladován v rozmezí 25–27 °C, dojde k nárůstu DKP přibližně čtyřnásobně ve srovnání s tím, pokud je nápoj skladován ve 4–5 °C [9].

Rozpustnost při pH 7 a pokojové teplotě je 10 g/l. Je nerozpustný v oleji a rozpustnost v ethanolu je velmi malá (0,37 %). Bod tání je při 190 °C, avšak při dalším zvyšování teploty aspartam tuhne a k tání znovu dochází při 246–247 °C [9]. V kyselých vodných prostředích se v závislosti na pH a teplotě hydrolyzuje esterová vazba a vzniká dipeptid (derivát 2,5-dioxopiperazinu) a methanol. Dioxopiperazin dále poskytuje hydrolyzou lineární dipeptid

a konečnými produkty reakce jsou aminokyseliny kyselina asparagová a fenylalanin. I tyto reakce mají za následek pokles sladké chuti. Proto není aspartam vhodný pro všechny potraviny (zejména nevhodný je pro potraviny kyselé) [7].

2.4 Výroba

Výroba aspartamu může být dvěma způsoby, a to chemickou či enzymatickou cestou. Chemická syntéza zahrnuje reakci kyseliny L-asparagové a L-fenylalaninu. L-fenylalanin reaguje s anhydridem kyseliny asparagové za vzniku aspartamu. Po rekrystalizaci se získá čistý aspartam. Vzniká jak α -aspartam tak β -aspartam, proto je nutná separace pro získání pouze α -aspartamu, jelikož modifikace β není sladká. Enzymatické metody umožňují použití racemických výchozích látek a tento postup má velkou výhodu, a to vznik pouze α -aspartamu. Vhodným enzymem pro výrobu je termolyzin, který je izolován z *Bacillus thermoproteolyticus*. *Bacillus thermoproteolyticus* ovšem nemá ověření bezpečnosti pro použití jako úmyslně přidávaná látka do potravin a krmiv. Metody velkovýroby jsou založené na kondenzaci kyseliny L-asparagové s methylesterem L-fenylalaninu za vzniku směsi methylesteru β -L-aspartyl-L-fenylalaninu a methylesteru α -L-aspartyl-L-fenylalaninu. Při okyselení kyselinou chlorovodíkovou vznikne sraženina, po jejíž neutralizaci vzniká aspartam [8; 13].

2.5 Analytické stanovení

Stanovení aspartamu, ať už samotného nebo v kombinaci s jinými sladidly, je většinou založené na extrakci s přečištěním a následnou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s použitím různých detektorů (např. UV detekce). Dalším možným způsobem je tenkovrstvá chromatografie, iontová chromatografie, spektrofotometrie či kombinace HPLC a hmotnostní spektrometrie, která nevyžaduje dokonalé přečištění, a je vhodná i pro nižší obsahy detekované látky, v tomto případě aspartamu [8; 9; 13].

2.6 Absorbce, distribuce a metabolismus vylučování aspartamu

Studie u potkanů, psů a opic ukázaly, že po orálním podání aspartam hydrolyzuje, a to buď tenkým stěvě, nebo v buňkách sliznice lemujících gastrointestinální trakt (GI). Zatímco má aspartam poločas rozpadu v kyselých vodných roztocích v *ex vivo* podmínkách několik dní, jeho poločas rozpadu v GI traktu je řádově několik minut. Zrychlená hydrolyza aspartamu v GI traktu je zprostředkována specializovanými enzymy ve stěvě, jako jsou esterázy a peptidázy. Produktem těchto reakcí je methanol a aminokyseliny (kyselina asparagová a fenylalanin).

Hydrolyza aspartamu uvolňuje maximálně 10 hmotnostních procent methanolu, dále 50 hmotnostních procent fenylalaninu a 40 hmotnostních procent kyseliny asparagové. Hydrolyza aspartamu je velmi účinná a množství aspartamu, které vstupuje do krevního řečiště bylo v několika studiích pod hranicí detekce [8; 9; 14].

U lidí byla testována dávka 500 mg aspartamu ve vodě. Výsledky ukázaly, že radioaktivně označený aspartam byl zpracován podobným způsobem, jako u přírodní aminokyseliny fenylalaninu. Pokud byla dobrovolníkům podána jednorázová perorální dávka 34 mg/kg hmotnosti aspartamu, nebylo pozorováno zvýšení koncentrace methanolu v krvi (při limitu detekce 3,5–4 mg/l). Po podání dávky 50 mg/kg hmotnosti aspartamu se pohybovala hladina methanolu na hranici detekce. Při dávkách 150 a 200 mg/kg hmotnosti přetrvával methanol v krvi déle, avšak 24 hodin po podání byl methanol v krvi pod hranicí detekce [9].

2.7 Zdravotní rizika aspartamu

Jak už bylo uvedeno v předchozí části, zdravotní rizika aspartamu jsou dlouho diskutovaným tématem, a to již od roku 1996, kdy vzniklo podezření na souvislost mezi nádory mozku a konzumací aspartamu. V roce 2002 zveřejnila francouzská agentura AFSSA¹ revizi bezpečnosti aspartamu. AFSSA dospěla k závěru, že aspartam nebyl genotoxický, a že dříve provedené testy karcinogenity u hlodavců nevykazovaly vztah mezi expozicí aspartamu a výskytem mozkových nádorů. S přihlédnutím ke všem aspektům studie nebyl aspartam vyhodnocen jako karcinogenní. Epidemiologické údaje z registrů onkologických onemocnění ve Francii neumožnily jednoznačně určit možný vztah mezi konzumací aspartamu a vznikem nádorů mozku a ukázaly, že prodej této látky ve Francii nebyl doprovázen nárůstem mozkových nádorů nebo zvýšením úmrtnosti na nádory mozku. EFSA² v roce 2013 dospěla k závěru, že aspartam jako potravinářská přídatná látka testovaná na experimentálních zvířatech neměla žádný karcinogenní potenciál [9]. Přestože je aspartam jako sladidlo povolený ve většině zemí, probíhají neustále další studie vlivu na zdraví a toto téma je stále velmi aktuální. Konkrétně EFSA shromažďuje data pro vydání nového stanoviska, které má uveřejnit tento rok, tedy v roce 2018.

¹Agence française de sécurité sanitaire des aliments

² European food safety authority

2.7.1 Genotoxicita a mutagenita

Aspartam byl testován na mutagenitu u kmenů *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA1538, TA98, TA 100, a to v dávce 5000 ug/misku. Testování proběhlo jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti metabolického aktivačního systému (potkaních jater) v dávkách od 10 do 5000 ug/misku. Při této studii nebyl aspartam vyhodnocen jako mutagenní. Zároveň i další studie potvrzují tento závěr [9; 15].

Genotoxicita aspartamu byla sledována na různých kmenech formou Amesova testu. Mutagenní účinek nebyl prokázán v kmenech TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1438 v koncentracích až do 5000 ug/misku, a to jak v přítomnosti, tak nepřítomnosti metabolické aktivace. Pozitivní mutagenní účinek byl však sledován po nitrozaci. Dále bylo zjištěno, že fenylalanin je mutagenní vůči E-coli kmenu K012 uvrB, ale není mutagenní vůči E-coli divokého typu uvrB, umuC a uvrB lexA [16].

Genotoxicita aspartamu byla studována pomocí hostitelem zprostředkovaného testu u myši. Myšim byl aspartam dávkován žaludeční sondou, a to v dávkách 0 (kontrolní vzorek), 1000, 2000, 4000, 8000 mg/kg tělesné hmotnosti a den (jako tři samostatné dávky podávané ve dvouhodinových intervalech po dobu pěti po sobě následujících dnů). Poté byly myši naočkovány pomocí *Salmonella typhimurium*. O tři hodiny později byly bakterie odebrány a hodnoceny na výskyt mutantů. Nedošlo k odhalení žádných mutantů [9].

V roce 2002 byla provedena studie genotoxicity dávky 2000 mg/kg in vivo, a to na švýcarských albino myších. Kontrola proběhla po třech a dvacetičtyřech hodinách v osmi myších orgánech pomocí kometového testu (jednobuněčná gelová elektroforéza). V této studii nebylo prokázáno žádné poškození DNA ve zkoumaných orgánech [17].

Genotoxicita byla zkoumána i ve studiu z roku 2010, a to pomocí testu mikrojaderní, chromozomální aberace a morfologie spermií u zvířat. Dávky aspartamu (250, 455, 500 a 1000 mg/kg) byly podávány v jedné dávce čtyřem různým skupinám zvířat. Tyto dávky byly podávány každý den po dobu jednoho týdne. Autoři uvedli, že aspartam v dávkách 455, 500, 1000 mg/kg vykazoval významný nárůst počtu mikronukleovaných polychromatických erytrocytů (indikují chromozomové poškození), celkových aberací a abnormálních spermií. Závěrem studie bylo, že aspartam je klastogenní látka, což znamená, že mění stavbu chromozomu [16].

Celkový závěr z dostupných studií uvedených v článku [9] o genotoxicitě aspartamu je, že aspartam není genotoxický.

Tyto závěry uvedené v článku od EFSA [9] potvrzují i další novější studie. První, která byla publikována v roce 2018, se zabývala právě genotoxicitou a mutagenitou aspartamu. Zde popsané studie prováděly testy na bakteriálních a savčích buněčných systémech. Studie se ztotožňuje s dříve provedenými *in vitro* bakteriálními studiemi, které se týkaly mutací, chromozomálních aberací a mikronukleových testů. Analýza bakteriálních testů v přítomnosti i nepřítomnosti metabolické aktivace ukázala, že aspartam nevytváří pozitivní mutagenní odpověď [18]. Další studie, která se též zabývala genotoxicitou *in vitro* a *in vivo*, potvrzuje předchozí závěry EFSA, konkrétně, že aspartam nezpůsobuje genové mutace, a ani jinak neovlivňuje genotoxickou aktivitu [19].

2.7.2 Karcinogenita

V roce 1999 byla provedena studie na krysách, které byly vystaveny dávkám aspartamu. Po vystavení dávce 100 000 ppm byl sledován pozitivní růst počtu nádorů a vznik leukémie, a to hlavně u samic. Závěrem této studie bylo, že v těchto experimentálních podmínkách je aspartam klastogenní látka [20].

Komplexní studie karcinogenity u myší byla provedena na 36 samicích a 36 samcích. Myším byly podávány dávky od 0 do 4000 mg/kg a den po dobu 104 týdnů. Hodnocenými kritérii byl fyzický vzhled, chování, přírůstek hmotnosti, spotřeba krmiva, přežití, vyšetření očí, kontrola orgánů, výskyt nádorů atd. Fyzický vzhled ani chování zvířat nebylo ovlivněno. Přírůstek hmotnosti u samců myší ve všech skupinách byl výrazně nižší než u kontrolních samic, což bylo doprovázeno celkovou sníženou spotřebou krmiva během prvního roku. Rozdíly však byly malé, a proto nebyly považovány za významné. Změny se neodehrály ani v hematologických vyšetřeních či orgánech po pitvě. K významným změnám nedošlo v žádné zkoumané kategorii, a proto neexistují žádné důkazy o karcinogenitě. V této studii byla stanovena hodnota NOAEL (no observed adverse effect level), která udává množství látky, při které ještě není pozorován škodlivý účinek. Stanovená hodnota činila 4000 mg/kg hmotnosti a den [9].

Studie byla provedena i na krysách, zkoumaná skupina obsahovala 40 samců a 40 samic. Studie též trvala 104 týdny. Dávky aspartamu byly 0, 1000, 2000, 4000, 8000 mg/kg hmotnosti a den. Nevzniklo zde žádné podezření, že by aspartam ovlivňoval chování či fyzický vzhled zvířat. U skupiny, která dostávala dávku 8000 mg/kg a den, došlo ke zpomalení růstu, ale též k poklesu spotřeby krmiva, tudíž se tento vliv nepřičítal aspartamu. Míra přežití po 104 týdnech byla srovnatelná u všech skupin krom skupiny 8000 mg/kg a den, kde byla statisticky větší úmrtnost. Klinická vyšetření neukázala žádné statisticky významné změny hodnot. Nedošlo ani

ke změně hmotnosti orgánů či histopatologickým změnám orgánů. V plicích byly nalezeny mírně zvětšené pneumocyty (v důsledku zvýšení počtu buněk pneumocytů) u samic ve skupině 8000 mg/kg a den a u samců byla pozorována nižší funkce ledvin. Autoři dospěli k závěru, že podávání aspartamu krysám po dobu téměř dvou let nevedlo k nežádoucím účinkům nebo zvýšené incidenci novotvarů. Na základě těchto pozorování byla stanovena NOAEL na 4000 mg/kg hmotnosti a den. V dodatečné studii bylo provedeno doplňkové histopatologické vyšetření mozků z předchozích dvou studií karcinogenity. U potkanů, kterým byla podávána dávka aspartamu, byl zjištěn výskyt nádorů mozku, a to ve dvanácti případech. Druhy nádorů v daných skupinách jsou uvedeny v následující tabulce. Na základě těchto dvou studií dospěli autoři k závěru, že nejsou žádné důkazy o intrakraniálním (nitrolebním) nádorovém účinku [21].

Tabulka 4 - Výskyt nádorů [21]

Intrakraniální novotvary	Samci (dávka aspartamu/kg a den)					Samice (dávka aspartamu/kg a den)				
	Kontrola	100	2000	4000	8000	Kontrola	1000	2000	4000	8000
		0								
Přežili	23/60	21/40	23/40	21/40	21/40	26/60	23/40	20/40	14/40	10/40
Astrocytom	0/60	1/40	0/40	0/40	0/40	0/60	1/40	0/40	0/40	0/40
Astrocytom+ Ependymální gliom	0/60	1/40	1/40	1/40	0/40	0/60	1/40	0/40	0/40	0/40
Oligodendrogliom	0/60	0/40	0/40	1/40	0/40	0/60	0/40	0/40	0/40	0/40
Ependymální gliom	0/60	0/40	0/40	2/40	0/40	0/60	0/40	0/40	1/40	0/40
Meningeální sarkom	0/60	0/40	0/40	0/40	0/40	0/60	0/40	0/40	0/40	1/40
Nezařazený gliom	0/60	0/40	0/40	0/40	0/40	0/60	0/40	0/40	0/40	1/40

V roce 2006 zhodnotila Vědecká komise pro potravinářské přídatné látky, aromatické látky, pomocné látky a materiály pro potraviny (AFC) dlouhodobou studii karcinogenity u potkanů vystavených působení aspartamu prováděnou Evropskou nadací Ramazzini, která udávala karcinogenní potenciál aspartamu. Na základě všech dostupných důkazů dospěla AFC k závěru, že neexistuje žádný důvod k revizi předchozího hodnocení a stanoveného ADI pro aspartam (40 mg/kg hmotnosti a den), který byl stanoven v roce 1984 a aspartam není karcinogenní [9].

Další dlouhodobá studie karcinogenity u myši vystavených působení aspartamu probíhala od dvanáctého dne plodu až do smrti. Z této studie vzniklo podezření na vztah mezi příjmem uměle slazených nealkoholických nápojů a předčasným porodem a také podezření, že aspartam způsobuje rakovinu jater a plic u švýcarských samců myši. EFSA dospěla k závěru, že neexistují žádné důkazy, které by podpořily tvrzení, že uměle slazené nealkoholické nápoje způsobují riziko předčasného porodu či karcinogenitu a pro podporu tohoto tvrzení jsou potřeba další důkazy a studie [9; 22].

Dle aktuálních informací ze studie [18] nebyly shledány nové závěry ohledně karcinogenity aspartamu. Studie, která je uvedena v této publikaci, analyzovala myši, které byly vystaveny dávce až do 2000 mg/kg aspartamu na den. Tato dávka ovšem neměla žádný účinek na karcinogenitu, cytotoxicitu ani klastogenní aktivitu u buněk kostní dřeně. Bylo zkoumáno 1000 erytrocytů v jednom z odběrů po 24 nebo 48 hodinách. U dávky 1000 mg/kg a den byly jisté náznaky vlivu na buňky kostní dřeně, ale nebyly poskytnuty žádné důkazy toxicity buněk kostní dřeně. Tato studie potvrzuje závěry ze studie [9], a to konkrétně, že je aspartam nemutagenní a nemá žádný vliv na karcinogenitu.

Další studie, která proběhla, sledovala 56 pacientů, a to konkrétně dětí. Závěr této studie vyvrátil souvislost mezi konzumací aspartamu v těhotenství a vznikem nádorů mozku [16].

2.7.3 Studie vlivu na vývoj

Vývojová toxicita byla zkoumána u myši, kterým byl aspartam podáván ve stravě (jednalo se o 36 gravidních samic). Po porodu byly samice usmrceny a plody byly vyšetřeny. Dle dostupných informací nedošlo k abnormalitám ve vývoji a NOAEL byla stanovena na 5700 mg/kg a den [9].

Další studie proběhla na krysách, a to při dávkách 0, 2000, a 4000 mg/kg a den. Během laktace byly potkanům podávány dávky 2500 a 4400 mg/kg a den, během březosti 3600 a 6800 mg/kg a den. Autoři zaznamenali významné snížení tělesné hmotnosti mláďat při porodu, a to pro skupinu, která dostávala nejvyšší dávky. V této skupině byla také pozorována zvýšená úmrtnost po odstavení. Samice vystavené vysoké dávce přijímaly méně krmiva a došlo ke snížení hmotnosti. Na základě dostupných informací byla stanovena NOAEL na 2000 mg/kg a den (konkrétně 2500 mg/kg a den během březosti a 3600 mg/kg a den během laktace) [9].

Podobná studie proběhla na 30 samicích krys, kterým byly podávány různé dávky (0, 2000, 4000 mg/kg a den). Hodnocené parametry zahrnovaly úmrtnosti matek, tělesnou hmotnost, spotřebu krmiva, velikost plodu, fetální velikost atd. Průměrná spotřeba krmiva byla srovnatelná u kontrolní skupiny a skupiny, která dostávaly nízkou dávku. U skupiny, která

dostávala vysokou dávku, došlo k poklesu hmotnosti o 15 % oproti období před studií. Spotřeba krmiva se postupně obnovovala a dosáhla normálních hodnot na konci studie. U 47 vrhů (589 mlád'at) nebyly pozorovány žádné účinky na vývoj vyvolané léčbou. NOAEL zde byla stanovena na 4000 mg/kg a den [9].

Nové závěry ohledně vlivu na vývoj udávají, že podávání vysoce intenzivních sladidel (včetně aspartamu) potkanům během březosti může mít vliv na rozvoj metabolického syndromu u potomků (rozvoj inzulínové rezistence, obezity, diabetu druhého typu či vysokého tlaku). Nicméně vliv na člověka nemusí být stejný jako na potkany, proto je nutné tyto závěry dále potvrdit [23].

2.7.4 Studie vlivu na reprodukční toxicitu

Byla provedena dvougenerační studie reprodukční toxicity u potkanů Charles River albino (v každé skupině bylo 12 samců a 24 samic), aspartam byl podáván v dávkách 0 (kontrolní dávka), 2000 a 4000 mg/kg hmotnosti a den. Hodnocené parametry zahrnovaly přežití, tělesnou hmotnost, spotřebu krmiva, fyzický vzhled. Ukazatele plodnosti byly těhotenství, porod živého plodu, laktace a další. Všechny parametry byly srovnatelné mezi kontrolní a testovanou skupinou, až na menší tělesnou hmotnost u testované skupiny, a to jak v generaci F1, tak v generaci F2. Potomci potkanů, kteří dostávali vysokou dávku, byly statisticky nejmenší ze všech [9].

Studie reprodukční toxicity probíhala i na mlád'atech z přechodí studie (generace F2), kteří dostávali dávku 0, 2000, 4000 mg/kg a den. Po 24 hodinách, 5, 15 a 21 dnech po porodu bylo usmrceno deset mlád'at z každé skupiny a byla provedena hematologická, klinická a histopatologická vyšetření vybraných tkání. V této studii nedošlo k žádným významným změnám hodnot po vyšetření a NOAEL z těchto studií byla stanovena na 2000 mg/kg tělesné hmotnosti a den [9].

Účinky na reprodukci byly zkoumány u potkanů, kterým byly podávány dávky 0, 2, 4, a 6 % aspartamu (m/m), a to jak během chovu, gestace, laktace, tak po odstavení. Nebyl pozorován žádný vliv na tělesnou hmotnost před porodem nebo přírůstek hmotnosti po porodu, ale potkani, kteří byli vystaveni nejvyšší dávce aspartamu během laktace, měli menší hmotnost než ostatní skupiny. Zvýšená úmrtnost byla pozorována u mlád'at, která byla krmena nejvyšší dávkou aspartamu [24].

Expozice byla studována i v nedávné studii, která se konkrétně zabývala vlivem aspartamu na mlád'ata myší, jejichž matkám byl po dobu březosti podáván aspartam. Autoři uvedli, že zvířata, která byla vystavena aspartamu po celou dobu prenatálního vývoje, mohou

ztratit hypotalamickou kontrolu nad požíváním potravy, zejména pokud jde o sladké potraviny. Zvířata, jejichž matky dostávaly dávky aspartamu během březosti, spotřebovala více krmiva než ta, která pocházela od matky, jež byla krmena standardní stravou. Toto zjištění platilo jak při krátkodobé, tak dlouhodobé konzumaci aspartamu v těhotenství a mohlo by naznačovat souvislost mezi vývinem účinného mechanismu sytosti a konzumací aspartamu v těhotenství, což by mohlo v negativním důsledku vést k přejídání. Vzhledem k novým faktům je však třeba provést další studie, které se budou týkat této problematiky [21].

2.7.5 Expozice aspartamu a jeho derivátům

Aspartam se běžně vyskytuje v potravinách a expozice aspartamu dle pěti generačních skupin je následující: u batolat je průměrná expozice 3,2–16,3 mg/kg hmotnosti a den, u dětí 2,3–12,8 mg/kg hmotnosti a den, u teenagerů 0,8–4,0 mg/kg hmotnosti a den, u dospělých 0,8–8,6 mg/kg a den a u důchodců 0,5–4,4 mg/kg a den [9].

Expozice methanolu je nejvíce způsobená právě aspartamem, který obsahuje přibližně deset hmotnostních procent methanolu, nicméně je obsažen i v přírodních zdrojích a konzumován ve stravě či je přijímán z endogenních zdrojů. Průměrná expozice methanolu ze všech zdrojů aspartamu je 0,05–3,7 mg/kg a den. Přírodním zdrojem je ovoce a zelenina. U ovocných šťáv se koncentrace methanolu velmi liší (1–640 mg/l methanolu). Obsah methanolu závisí nejen na koncentraci v konkrétním ovoci, ale také na methanolu uvolněném z pektinu působením pektinesterázy během zpracování a skladování. Methanol se též může vyskytovat jako zbytek výrobního procesu alkoholických nápojů. Celková expozice methanolu ze všech přírodních potravin je průměrně 0,2–1,4 mg/kg a den. Z endogenních zdrojů se za hlavní zdroj methanolu považuje gastrointestinální trakt, kde se z požitých pektinů vytváří methanol a endogenní produkce jiných částí těla, jako jsou játra a mozek. Při testu, kdy byla mužům na lačno měřena koncentrace methanolu v dechu, autoři dokázali, že endogenní produkce methanolu lidským tělem, měřená po dobu 6–12 hodin dosahovala koncentrace 300–600 mg/den methanolu. Při dalším pokusu autoři dokázali, že při požití 10–15 g pektinu (což odpovídá 1 kg jablek) vedlo k dodatečné výrobě 400–1400 mg methanolu denně. Vzhledem k tomu, že se methanol přirozeně vyskytuje v lidském těle a koncentrace vytvořené z aspartamu nejsou nikterak vysoké, není methanol vytvořený z aspartamu rizikem pro zdraví. To potvrdila i studie provedená Britským výborem pro toxikologii chemických látek v potravinách, spotřebních výrobcích a životním prostředí [9; 25].

Dalším metabolitem aspartamu je již zmíněné DKP, ADI pro DKP stanovené v roce 1980 bylo 7,5 mg/kg tělesné hmotnosti a den). V roce 1983 bylo stanoveno nové ADI, a to ve

výši 30 mg/kg a den. Podle nařízení Komise EU č. 231/2012 může aspartam obsahovat až 1,5 % DKP (vztaženo na sušinu) [9].

2.7.6 Akutní toxicita aspartamu

Akutní toxicita byla sledována u tří druhů - myši, potkanů a králíků. Aspartam byl podáván žaludeční sondou v dávkách 5000 mg/kg hmotnosti. Zvířata byla pozorována přerušovaně během 7 dnů po podání dávky a nebyly zaznamenány žádné významné motorické nebo behaviorální změny chování. V experimentálním období nebyli sledováni žádná úmrtí, podle autorů byly hodnoty LD₅₀ vyšší než nejvyšší dávky podávané každému druhu [9].

2.7.7 Krátkodobá a subchronická toxicita

Tato studie byla prováděna na myších, které dostávali dávku 3000, 5000 a 13 000 mg/kg hmotnosti aspartamu. Nebyl pozorován žádný rozdíl v tělesné hmotnosti, žádné nežádoucí klinické stavy a 100 % zvířat přežilo. V subakutní studii byl aspartam podáván po dobu čtyř týdnů krysám, a to v dávce 0, 2000, 4000 nebo 10 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Během této studie nebyly zaznamenány žádné nežádoucí klinické stavy, pouze došlo k poklesu spotřeby krmiva, a to konkrétně u samic, kterým byly podávány vysoké dávky aspartamu. Nedošlo k žádným změnám klinického stavu a 100 % zvířat přežilo. Po usmrcení byla provedena patologická prohlídka, a ani v tomto případě nebyly zaznamenány žádné významné změny [9].

Studie byla provedena i na psech rasy Beagle, a to po dobu osmi týdnů. Zvířata po tuto dobu dostávala dávku 5 nebo 125 mg/kg hmotnosti. V průběhu studie byli psi popsáni jako celkově normálního vzhledu i chování a všichni přežili období studie. Na konci osmého týdne byla zvířata usmrcena. Patologickým vyšetřením nebyly zjištěny žádné konzistentní změny jak v klinickém, histopatologickém tak hematologickém vyšetření [9].

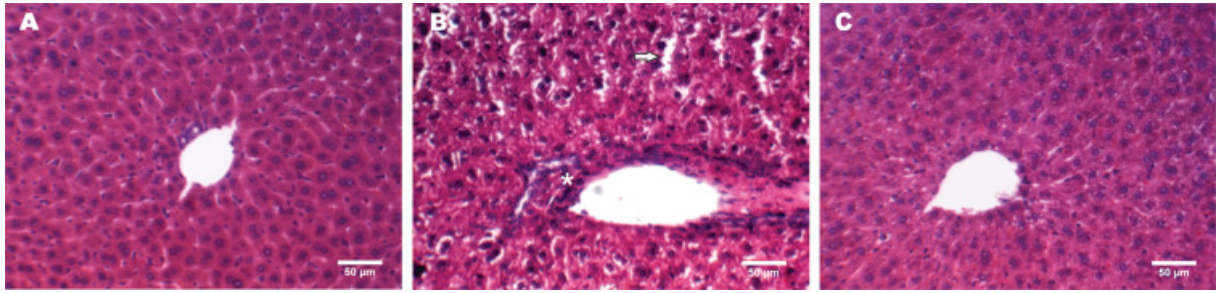
Další studie krátkodobé a subchronické toxicity byly studovány ve dvou studiích, a to na antioxidačních systémech a poraněných tkání v játrech potkanů. Zvířatům se po dobu šesti měsíců dávala dávka 3 ml aspartamu, které obsahovaly 500 nebo 1000 mg/kg tělesné hmotnosti. Kontrolním zvířatům se podával stejný objem vody. Rozsah enzymových aktivit byl testován v séru, homogenátech jater a mozku. Bylo také provedeno vyšetření jater a mozku. Autoři uvedli, že krysy, které dostaly aspartam v dávce 1000 mg/kg tělesné hmotnosti, vykazovaly významné sérové zvýšení aktivity enzymů (např. alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza). Naopak došlo k poklesu enzymů v játrech například glutathion (GSH), glutathionperoxidáza. Histopatologické vyšetření odhalilo infiltraci leukocytů v játrech

potkanů, kteří dostali dávku 1000 mg/kg, a také mírné cévní kongesce (hromadění krve ve zduřených uzlinách či orgánech). Závěrem této studie dospěli autoři k názoru, že dlouhodobá konzumace aspartamu vede k poškození jaterních buněk, a také uvedli možný vztah mezi toxicitou aspartamu a hladinou glutathionu. Glutathion má funkci ochrany organismu před oxidativním stresem. Jeho nízký obsah v těle může způsobuje rychlé stárnutí, diabetes, nemoci plic či zažívacího ústrojí. Některé studie uvádí, že může hrát roli i v prevenci vzniku rakoviny [9; 26].

K této studii hodnotící komise uvedla, že pro každou skupinu bylo použito pouze šest krys a expozice nebyla dlouhodobá, ale pouze šest měsíců. Dále byl také odlišný způsob podávání dávky (buď ve vodě či žaludeční sondou) a byly testovány pouze dvě dávky, kde vyšší dávka byla 25x vyšší než ADI. Změny byly též mírné a kvalitativně omezené (došlo ke změnám hodnot pouze pár enzymů), a proto je nelze interpretovat bez přítomnosti historických hodnot enzymů pro testované potkany. Zánětlivá infiltrace leukocytů v játrech je též proměnlivá a běžná i v kontrolní populaci potkanů. Z tohoto tvrzení lze vyvodit, že pokud by závěr studie měl být relevantní, musela by studie probíhat na větším vzorku potkanů [9].

Studie z roku 2017 uvádí podobné závěry. Týkala se vlivu aspartamu na játra, glutathion a transsulfurační cestu aspartamu. Myši byly testovány po dobu devadesáti dní a aspartam jim byl podáván sondou, a to nejprve šedesát dní aspartam a mezi šedesátým a devadesátým dnem studie aspartam s N-acetylcysteinem (NAC). N-acetylcystein funguje jako antidotum při jaterních intoxikacích. Je také prekurzor cysteinu, jehož dostupnost je omezujícím faktorem pro syntézu glutathionu. Po usmrcení myši byla analyzována játra (konkrétně supernatanty), která byla důkladně připravena na analýzu metabolitů pomocí kapalinové chromatografie. Hodnoty aspartátaminotransferázy (AST) a alanintransferázy (ALT) v plasmě byly zvýšené. Hodnoty ALT se vrátily do normálních hodnot při podávání aspartamu s N-acetylcysteinem [27].

Podávání aspartamu zvýšilo hepatocelulární poškození (obrázek B), vyvolalo infiltraci leukocytů (na obrázku značené hvězdičkou), redukci jaderné oblasti a degeneraci hepatocytů (označeno šipkou). Po podávání N-acetylcysteinu se obnovila histologická stavba (obrázek C), která byla srovnatelná se stavbou u kontrolních myši (obrázek A). Z tohoto vyplývá, že chronická konzumace aspartamu může vést k toxické hepatitidě [27].



Obrázek 2 – Histologické barvení jaterních buněk, světelný mikroskop [27]

Aspartam též snížil hodnoty GSH o 30 %, po podávání N-acetylcysteinu se hodnoty GSH vrátily do normálu. Autoři uvádí, že podávání NAC může být vhodné pro osoby, které pravidelně a dlouhodobě konzumují aspartam [27].

2.8 Epidemiologické studie u lidí

2.8.1 Studie konzumace aspartamu a předčasného porodu

V roce 2010 byly provedeny studie, které se zabývaly souvislostí mezi konzumací uměle slazených nápojů a předčasného porodu. Tato souvislost byla zkoumána mezi účastníky od ledna 1996 do října 2002. Autoři uvedli hned několik důvodů pro provedení analýzy:

- konzumace uměle slazených nápojů může být spojena s hypertenzí, která je známým rizikovým faktorem pro předčasný porod
- konzumace uměle slazených nápojů souvisí s metabolickým syndromem a diabetes mellitus 2. typu, vysoká koncentrace glukózy v krvi byla spojena s kratším trváním těhotenství
- metanol, jakožto metabolit aspartamu způsobuje v malých dávkách kratší dobu těhotenství

Tato studie zahrnovala 91 827 těhotných žen z Dánska, což odpovídá přibližně 35 % všech porodů během tohoto období. Pro studii bylo analyzováno 59 334 (64,6 %) žen (zbytek žen nebyl součástí studie, protože nedodaly dostatek informací o stravě během těhotenství). Expozice byla zjištěna přibližně ve 25. týdnu těhotenství prostřednictvím dotazníku o frekvenci potravin za poslední měsíc, a to včetně spotřeby jednotlivých potravin (sycené slazené nápoje, slazené nápoje, uměle slazené sycené nápoje, uměle slazené nesycené nápoje). Podskupina 103 žen vyplnila dotazník ještě ve 33–35. týdnu těhotenství. Hodnocení expozice nebylo specifické pro jednotlivá sladidla a nepřihlédlo k jiným zdrojům sladidel. Předčasný porod byl definován

jako porod, ke kterému došlo před 37. týdnem těhotenství. Analýza byla upravena o další faktory předčasného porodu (věk matky, výška matky, BMI před těhotenstvím, kouření během těhotenství atd.). Autoři uvedli, že ve skupině s největší expozicí byly srovnatelné hodnoty předčasného porodu jako ve skupině, která nápoje nekonzumovala. Tato studie měla velký počet účastníků, což bylo její předností, naopak jejími nedostatky bylo nerozdělení druhů sladidel a neuvážení jiných zdrojů aspartamu, potažmo methanolu (ovoce, zelenina) [9].

Studie z roku 2012 zkoumala vztah mezi konzumací uměle slazených nápojů, nápojů slazených cukrem a předčasným porodem u velké skupiny norských žen (konkrétně 60 761). Konzumace sladidel byla zjištěna dotazníkem zhruba ve 22. týdnu těhotenství, který pokrýval prvních 4–5 měsíců těhotenství. Z těchto údajů byl vypočítán celkový příjem uměle slazených nápojů a nápojů slazených cukrem. Předčasný porod byl definován jako porod před 37. týdnem gestace. Gestační věk³ byl stanoven ultrasonograficky v 17–18. týdnu těhotenství. Analýza byla, též jako v předchozím případě, doplněna o faktory, které jsou významné pro předčasný porod (věk matky, BMI matky před porodem, rodinný stav, kouření během těhotenství atd.). Nebyly zjištěny žádné významné počty předčasných porodů ve skupině, která konzumovala uměle slazené nápoje, hodnoty byly srovnatelné se skupinou, která nápoje nekonzumovala. Závěr studie byl stejný jako v předchozí studii, a to, že riziko předčasného porodu ve vztahu ke konzumaci uměle slazených nápojů je velmi malé, respektive žádné [28].

Další studie navázala na předchozí studii a zkoumala souvislost konzumace uměle slazených nápojů v těhotenství a výskytu alergie u dětí. Data o zdravotním stavu dětí byla získána v 18 měsících a 7 letech. Při analýze byly zohledněny další faktory pro vznik astmatu (BMI před těhotenstvím, fyzická aktivita, kojení, socioekonomický stav, pohlaví dítěte, anamnéza astmatu a alergií u matky a otce, příjem energie matky během těhotenství). Po analýze došli autoři k závěru, že spotřeba uměle slazených nápojů měla souvislost s výskytem astmatu u dětí, naopak výskyt alergické rýmy neměl spojitost s konzumací uměle slazených nápojů v těhotenství [29].

Vzhledem k tomu, že z epidemiologického hlediska bylo zvýšení rizika jen malé, lze závěry studie považovat pouze za malé naznačení nebezpečí. Před konečným závěrem ohledně aspartamu musí být aspartam déle a specifitěji zkoumán v souvislosti k výskytu astmatu a alergické rýmy.

³ Gestační věk – délka těhotenství vypočtená ode dne začátku poslední menstruace matky.

2.8.2 Studie zabývající se souvislostí mezi konzumací aspartamu a bolestí hlavy

Studie z roku 1994 analyzovala osoby citlivé na konzumaci aspartamu, kterým byla podávána dávka aspartamu 30 mg/kg hmotnosti a den po dobu jednoho týdne, anebo placebo (mikrokrytalická celulóza v kapslích). Účastníci si stěžovali na bolesti hlavy ve 33 % případů během příjmu aspartamu, ve srovnání s 24 % během příjmu placebo. Nicméně ze studie nevyplývaly další faktory vlivu aspartamu na bolesti hlavy (délka trvání bolesti, intenzita bolesti). Autoři uvedli, že malá skupina populace může být citlivá na konzumaci aspartamu, ale vzhledem k malému počtu účastníků nelze vyvodit relevantní závěr studie [9].

U osob náchylných na migrény vyvolaly velké dávky (900–3000 mg/kg tělesné hmotnosti a den) zhoršení migrény. Migréna může vznikat i jako alergická reakce na formaldehyd, což je vedlejší produkt aspartamu [30].

2.8.3 Studie karcinogenity

Další studie z roku 2005 se zabývala konzumací aspartamu a souvislosti s výskytem karcinomu pankreatu. Studie sledovala 88 794 žen a 49 364 mužů, kteří neměli rakovinu. Během 20 let sledování se vyskytlo 379 případů rakoviny pankreatu. Autoři této studie uvedli, že konzumace aspartamu neovlivňuje riziko výskytu rakoviny pankreatu [16].

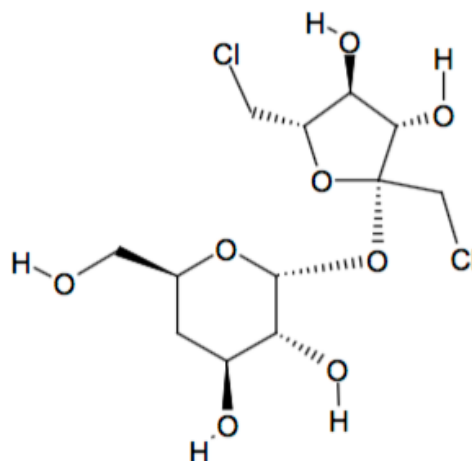
Studie z roku 2006 sledovala 285 079 mužů a 188 905 žen ve věku 50–71 let, kteří konzumovali čtyři nápoje s obsahem aspartamu denně. Během více než pěti let sledování bylo zjištěno 1 888 hematopoetických karcinomů a 315 maligních gliomů. Autoři dospěli k závěru, že neexistuje vztah mezi spotřebou aspartamu a vznikem hematopoetického karcinomu a gliomů [16].

3 SUKRALÓZA (E 955)

Sumární vzorec: $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$

Molekulová hmotnost: 397,64 g/mol

CAS číslo: 56038-13-2 [31]



Obrázek 3 - Strukturní vzorec sukralózy (vlastní zpracování)

3.1 Obecné informace

Sukralóza je jedním z novějších sladidel, které se používají v potravinářské průmyslu. Vyrábí se ze sacharózy procesem chemické modifikace, což vede ke zvýšení sladkosti, udržení příjemné chuti cukru a tvorbě velmi stabilní molekuly. Proto je sukralóza vhodná pro použití při nízkém a neutrálním pH, ale stejně tak i pro tepelně zpracované potraviny. Jako sladidlo je velmi univerzální, lze použít v pestré škále potravin a nápojů a umožňuje výrobu sensoricky dobrých, nízkokalorických potravin. Sukralóza je schválená pro použití v potravinách ve většině zemí světa a stala se velmi populární jak pro spotřebitele, tak i pro potravinářský a nápojový průmysl [31].

3.2 Historie

V sedmdesátých letech 20. století probíhal intenzivní výzkumný program, který se zabýval vývojem nových náhrad cukru. Výzkumný program se zabýval přímo sacharózou a povahou její sladké chuti a faktory odpovědné za její příjemné chuťové vjemy. Konkrétně se touto problematikou zabývali vědci ze společnosti Tate & Lyle v Readingu v Anglii, a to ve spolupráci s profesorem Les Houghem na univerzitě v Queen Elizabeth v Londýně. Důležitým poznatkem z tohoto výzkumu bylo, že po halogenaci sacharózy ve vybraných

místech byla intenzivně zvýšena vnímavost její sladké chuti, což vedlo k dalším podrobným studiím a syntéze nových halogenových sloučenin. Struktura každého derivátu byla prověřena nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií a hmotnostní spektroskopií před tím, než byla testována dobrovolníky. Ochutnávka je jediný způsob, jak zjistit, zda je sloučenina sladká a jak intenzivně. Tímto testováním bylo zjištěno, že zintenzivnění sladkosti bylo omezeno na poměrně malou skupinu halogenovaných sloučenin. Klíčovými faktory pro zintenzivnění sladkosti byly retence hydroxylových skupin v pozicích 2, 3, 6 a třech dalších pozicích s velkým elektronegativním substituentem (halogen) [31]. Tetrachloro a tetrabromoderiváty vykazovaly největší nárůst sladké chuti, a to 2200x pro tetrachloro deriváty a 7500x pro tetrabromoderiváty sacharózy [32]. Nicméně tyto sloučeniny nesplňují kvalitu sladké chuti pro komerční sladidla. Zvýšení sladkosti spolu se ztrátou kvality a sensorických vlastností v těchto vysoce substituovaných sloučeninách je připisováno zvýšení lipofilnosti [33].

3.3 Výroba sukralózy

Sukralóza se vyrábí selektivním nahrazením tří hydroxylových skupin na molekule sacharózy třemi atomy chlóru za vzniku 1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β -D-fruktofuranosyl-4-chloro-4-deoxy- α -D-galaktopyranosidu. Základním procesem je selektivní ochrana (blokace) tří primárních hydroxylových skupin a transformace sekundárních hydroxylových skupin na octany. Odblokováním primárních hydroxylových skupin se získá 2,3,4,3',4'-pentaacetylsacharosa. Za vhodných podmínek může být tato sloučenina přeměněna na 2,3,6,3',4'-pentaacetylsacharózu. Poté dochází ke chloraci primárních hydroxylových skupin a po odstranění acetátových skupin vzniká hydrolýzou sukralóza [31; 33].

3.4 Organoleptické vlastnosti

Intenzita sladké chuti byla měřena oproti referenčnímu roztoku sacharózy, a to v koncentraci 2% nebo 9% roztoku sacharózy či sukralózy. Oproti roztoku o koncentraci 2% sacharózy byla sukralóza přibližně 750x sladší. Oproti roztoku 9% sacharózy přibližně 500x sladší. Obecně je sukralóza přibližně 600x sladší než sacharóza. Jelikož je sladivost sukralózy takto velká, je nutné dosáhnout velmi malých koncentrací v potravinářských produktech. Množství též závisí na použití dalších sladidel, pH, teplotě či přítomnosti dalších složek. Například pro oslazení 1 litru nápoje je zapotřebí 200 mg sukralózy, oproti 90–100 g sacharózy. Pro stanovení sensorických vlastností byl proveden rozsáhlý program výzkumu. Hodnocení probíhalo na základě konzumace vodných roztoků sukralózy a sacharózy. Hodnotitelé udělovali

body za různé vlastnosti roztoků v dotazníku, který byl poté vyhodnocen. Z dotazníku vyplynulo, že roztok sukralózy se při srovnání s 9% roztokem sacharózy vyznačuje vysokou senzoricou kvalitou sladké chuti bez hořké pachuti nebo kovových tónů. Sladká chuť sukralózy má o něco delší dobu trvání než sladká chuť sacharózy [31; 32].

Studie, která probíhala na krysách, se zabývala preferencí sukralózy oproti vodě. Krysám byly podávány dva druhy vody, a to konkrétně čistá voda a voda s různou koncentrací sukralózy (v rozmezí 0,0003–10 g/l). Do hodnoty koncentrace 0,3 g/l nebyl preferován žádný vzorek vody, nicméně při vyšších koncentracích sukralózy (více jak 0,3 g/l) byla krysami preferována čistá voda [34].

3.5 Použití

Sukralóza funguje dobře jako jediné sladidlo v potravinářských výrobcích, ale může se míchat i s dalšími výživovými či nevýživovými sladidly. Vhodné je použití ve směsích s nevýživovými sladidly například acesulfamem K, cyklamátem či sacharinem, ale s aspartamem nefunguje ve směsích velmi dobře. Ve směsích s výživovými sladidly funguje dobře s fruktózou, ale hůře se sacharózou [32].

Způsoby použití sukralózy závisí jak na senzoricích vlastnostech, tak i na vlastnostech fyzikálně-chemických. Tyto vlastnosti poté určují typy procesů výroby potravin, ve kterých lze sukralózu použít. Tyto vlastnosti jsou také důležité pro trvanlivost produktů, ve kterých je sukralóza použita. Již na začátku objevení sukralózy bylo předpovídáno její široké spektrum využití a nyní je součástí více než 4000 produktů na celém světě [32].

Jedna z největších oblastí použití sukralózy je v nealkoholických nápojích. Jak již bylo uvedeno výše, účinnost sukralózy je, stejně jako u dalších intenzivních sladidel, ovlivňována mnoha dalšími faktory. Pokud je sukralóza jediné sladidlo v nápoji, bude pravděpodobně vykazovat chuť 450–550x sladší než sacharóza. Vzhledem ke stabilitě a senzoricke kvalitní chuti může být sukralóza použita jako jediné sladidlo. Testováním bylo zjištěno, že pokud je v nápoji nahrazeno 30–40 % cukru sukralózou, nedojde prakticky k žádné změně chuti. Díky dobré rozpustnosti za běžných teplot je velmi snadné a rychlé připravit zásobní roztoky, které mohou být také čerpány nebo míchány bez nadměrného pění. Stabilita umožňuje použití v nápojích s nízkým pH a těch, které vyžadují tepelné ošetření, jako je pasterizace či vysoká teplota (UHT). Studie potvrzují, že nedochází k žádné měřitelné ztrátě sukralózy z nápojů s kolovou příchutí během jejich skladování [32; 33].

Sukralóza je též vhodná pro použití v mléčných výrobcích, a to jak v mléčných nápojích, tak ve zmrzlínách. V případě jogurtů může být sukralóza přidána do ovocné složky či do jogurtové kultury. Jelikož sukralóza není metabolizována ani mikroorganismy, může být přidána do jogurtů před fermentací. U zmrzlin je důležité nahradit i texturní funkci cukru, proto musí být sukralóza použita v kombinaci s dalšími ingrediencemi, aby spolehlivě a věrohodně nahradila cukr. Jako vhodná kombinace náhrady byla objevena kombinace polydextrózy a sorbitolu či maltitolu, které vhodně fungují se sukralózou, a tvoří strukturu podobnou sacharóze [32].

Použití v cukrovinkách je opět možné v kombinaci s dalšími složkami, jelikož sukralóza nahradí pouze sladkou chuť, a to po přidání velmi malého množství. Fyzikální vlastnosti nahradí kombinace polydextrózy a polyalkoholů. S těmito složkami je sukralózou možné nahradit cukr i v cukrovinkách [32].

U pečených potravin byla stabilita zkoumána za třech různých teplot a po různý čas působení teploty. Kynuté a piškotové moučníky, které byly pečený při teplotě 180 °C po dobu 25 minut, sušenky pečené při 210 °C po dobu 8 minut a krekrý při teplotě 230 °C po dobu 4 minut. Následná analýza těchto produktů potvrdila, že nedošlo ke ztrátě sukralózy během žádné z těchto úprav [32; 35].

Sukralóza našla své využití i v léčivech, kde se používá v produktech jako jsou vitamínové tablety a pastilky proti bolesti v krku [33].

3.6 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Fyzikálně-chemické vlastnosti sukralózy jsou typické pro většinu sladidel. Čistá sukralóza vypadá jako bílý, volně se sypající prášek, je bez zápachu, intenzivně sladká a volně rozpustná ve vodě. Prášek není hygroskopický při vlhkosti do 80 %. Bod tání je 130,25 °C [31]. Další vlastnosti jsou uvedeny v následující tabulce. Sukralóza sama o sobě nemá nutriční hodnotu, ale vzhledem k tomu, že se sukralóza používá ve velmi malých množstvích, součástí sladidla bývá vždy ještě nosič, často maltodextrin, který umožňuje přesnější dávkování množství sukralózy. Tyto nosiče již mívají energetickou hodnotu [36].

Tabulka 5 - Fyzikálně-chemické vlastnosti sukralózy [36]

Fyzikální struktura	Bílý krystalický prášek
Zápach	Prakticky bez zápachu
Chuť	Intenzivně sladká, podobná sacharóze
Sladivost	400-800x vyšší než sacharóza
Kalorická hodnota	Nulová
Rozpustnost	Dobře rozpustná ve vodě (28,2 g/100 ml při 20 °C), nerozpustná v kukuřičném oleji (0,1 g/100 g roztoku při 20 °C)
Specifická otáčivost	$[\alpha]_{20}^D +85,8^\circ$
Rozdělovací koeficient oktanol/voda	0,32 (20 °C)
Povrchové napětí vodných roztoků	71,8 mN/m (20 °C, 0,1 g/100ml)
Bod tání	125 °C
Molekulová hmotnost	397,64 g/mol

Sukralóza nevyžaduje zvláštní podmínky při skladování. Jako modifikovaný sacharid si zachovává sukralóza rozpustnost ve vodě, která spolu s vysokou stabilitou tvoří velmi funkční sladidlo v potravinářském průmyslu. Experimentálním měřením bylo ukázáno, že v teplotním rozmezí od 20–60 °C vzrůstá rozpustnost, a to z 28,2 g/100 ml při 20 °C na 66 g/100 ml při 60°C. Takto vysoká rozpustnost dovoluje použití sukralózy téměř ve všech vodných systémech v potravinářství. Je také vysoce rozpustná v methanolu, ethanolu, propylenglykolu a dalších rozpouštědlech, která se používají při výrobě potravin. Sukralóza je však nerozpustná v kukuřičném oleji, což je v souladu s její hydrofilní povahou. Sukralóza se proto vždy v soustavě vodné a lipidové fáze rozdělí s vodnou fází [37].

Další vlastností sukralózy je viskozita, která byla porovnávána s destilovanou vodou při různých smykových rychlostech ve viskozimetru. Nízká viskozita vodného roztoku sukralózy je vhodná, protože neovlivňuje potravinářské procesy, které zahrnují míchání a dispergaci jednotlivých potravinových složek [37]. Sukralóza též nemá aktivitu povrchově aktivních látek a nezpůsobuje tak nadměrné pění ve výrobcích, které vyžadují vysokorychlostní pění (např. nealkoholické nápoje) [33].

Sukralóza má velmi malý vliv na pH vodných roztoků, jelikož nemá žádné reaktivní funkční skupiny. Index lomu vodných roztoků sukralózy je lineární s koncentrací, což je výhodné pro rychlé zjišťování koncentrace sukralózy v roztoku. Vhodné, pro zjišťování

koncentrace, je užívat spolu s indexem lomu také kapalinovou chromatografií (HPLC), jelikož další látky přítomné v roztoku ovlivňují index lomu [37]. Jak již bylo uvedeno výše, selektivní chlorace sacharózy za vzniku sukralózy mění výslednou molekulu tím, že zesiluje její sladkost a zvyšuje stabilitu molekuly. Sukralóza tak nereaguje s jinými složkami potravin a je odolná vůči hydrolyze za extrémních podmínek (kyselé prostředí či teplota). Za extrémních podmínek kyseliny a tepla se sukralóza pomalu hydrolyzuje na monosacharidy 1,6-dichlorfruktózu (1,6-DCF) a 4-chlorogalaktózu (4-CG). Studie, která se zabývala změnou koncentrace sukralózy v nápojích uskladněných po dobu jednoho roku při 30 °C a 40 °C ukázala, že během této doby nevznikly žádné nové sloučeniny a nevznikly ani žádné anorganické chloridy [38]. Stabilita sukralózy byla testována i při pečení, a to na sušenkách a grahamových krekrech a byla vyhodnocena jako vhodná a bezpečná pro použití i do tepelně upravovaných potravinářských výrobků [36]. Tyto údaje byly plně v souladu s tvrzením, že sukralóza se při kyselé hydrolyze rozkládá pouze na 1,6-DCF a 4-CG. Hmotnostní bilance navíc ukázaly, že dva vzniklé produkty (1,6DCF a 4-CG) představují veškerou původní sukralózu v nápoji. Tato informace navíc potvrzuje fakt, že 1,6-DCF a 4-CG se dále nerozkládají [38].

3.7 Absorpce, vylučování a metabolismus

Většina studií se zabývala hodnocením bezpečnosti sukralózy, ale další otázka byla, jak se sukralóza metabolizuje jakožto sacharid. Vzhledem k sacharidové struktuře sukralózy bylo nutné zjistit, zda je v těle metabolizována za zisku energie či nikoliv. Byla provedena řada studií souvisejících s metabolismem za použití běžných pokusných zvířat (myši, potkani, psi). Tyto studie se zabývaly absorpcí požití sukralózy z gastrointestinálního traktu, distribucí vstřebané sukralózy, která byla vstřebána orgány a tkáněmi, metabolické transformace cirkulující sukralózy a její eliminaci z těla. Podobné studie proběhly i u dobrovolníků, aby bylo zjištěno, jestli je tento průběh stejný jak u zvířat, tak lidí. Výsledky těchto studií byly jednoznačné, a to, že sukralóza prochází tělem, aniž by došlo k rozpadu nebo ztrátě některého z připojených atomů chlóru. Údaje ze studie dobrovolníků ukázaly, že 85 % požití dávky sukralózy se ve stolici téměř nezměnilo, zatímco 15 % dávky se absorbuje z gastrointestinálního traktu, vstoupí do oběhu krve a je nedotčeně odbouráno do moči. Všechny tyto studie naznačují, že velmi malá frakce (zhruba 1–5%) užívané dávky se objevuje v moči jako vysoce polární glukuronidové konjugáty, které vznikají při biotransformaci [36].

Dále byly provedeny podobné studie u potkanů za použití sukralózy značené radioizotopy. Tyto studie potvrdily, že požitá sukralóza se nerozpadá na atomy chlóru a atomy

chlóru zůstanou připojeny k molekule. Zlomek pohlcené sukralózy, která je absorbována, se v těle volně pohybuje difuzí a nehromadí se v žádné tkáni nebo orgánu. Závěrem studií byl fakt, že sukralóza se metabolicky nechová jako sacharóza a tudíž ji lze považovat za nízkokalorické sladidlo [36]. Dalším faktorem pro hodnocení bezpečnosti bylo chronické a akutní vystavení dávkám sukralózy. Během 18 měsíců dostávaly krysy dávky sukralózy, a to cca 3 % ze stravy. Ani u těchto krys nedošlo k metabolické adaptaci střevní mikroflóry nebo adaptaci enzymů pro zpracování sukralózy [36]. Jak bylo uvedeno již dříve, sukralóza byla testována na vliv na metabolismus a metabolické pochody v těle, ale nebyl prokázán žádný vliv na vstřebávání či rozklad sukralózy.

Některé sacharidy podporují růst *Streptococcus mutans*, který je původcem zubního kazu. Zda sukralóza podporuje růst *Streptococcus mutans* bylo zjišťováno testováním na krysách, ovšem v prostředí sukralózy nebyl *Streptococcus mutans* schopný růstu. Proto byla sukralóza vyhodnocena jako nekariogenní, což znamená, že nevyvolává tvorbu zubního kazu [39].

3.8 Analytické stanovení

Typicky se stanovení sukralózy v potravinářských výrobcích provádí pomocí HPLC s refraktometrickým detektorem (RI). Retenční čas je zhruba 10 minut, jako mobilní fáze se používá směs 30 % methanolu a 70 % vody. Výrobky na bázi vody, jako jsou nealkoholické nápoje, mohou být analyzovány přímo, ačkoli ze sycených nápojů je vhodné před analýzou odstranit oxid uhličitý. Obecně platí, že před analýzou je nutné vzorek vyčistit, aby se odstranily potenciálně interferující složky [35; 36].

3.9 Bezpečnost sukralózy

Sukralóza, stejně jako všechna sladidla, spadá do skupiny potravinářských přídatných látek, a tím pádem pro ni platí předpisy o potravinářských přídatných látkách. Tyto právní předpisy o potravinářských přídatných látkách vyžadují, aby byl před uvedením látky na trh vypracován rozsáhlý soubor údajů a předložen k regulačnímu přezkoumání a schválení. Nejdůležitější a největší část tohoto souboru tvoří údaje a studie o bezpečnosti a vlivu na zdraví. Studie byly provedeny jak na sukralóze, tak na jejích produktech hydrolyzy 1,6-DCF a 4-CG. I když se sukralóza na monosacharidové složky hydrolyzuje velmi pomalu a v kyselých prostředích byly tyto sloučeniny v potravinách přítomné v řádech mikrogramů, byly tyto složky podrobeny stejnému testování toxikologických faktorů jako samotná sukralóza [36].

Studie na zvířatech, které umožnily interpretaci farmakokinetického a metabolického působení u lidí ukazují, že krysy myši a psi nakládají se sukralózou stejně jako lidé. Studie na krysách jsou odborníky mezinárodně považovány za spolehlivou interpretaci pro studium vlivu na člověka. Studie na toleranci sukralózy byly prováděny po různou dobu a při různých dávkách, nicméně závěr ze všech studií byl stejný, a to, že sukralóza nemá žádný vliv na citlivost na inzulín či glukózu. Příjem v těchto studiích činil až 1000 mg/osobu a den po dobu až 6 měsíců [40].

JECFA stanovila ADI v rozmezí 0-15 mg/kg za den. Tento ukazatel ADI byl založen primárně na klíčových dlouhodobých studiích na potkanech, na kterých byla testována dávka 1500 mg/kg za den. JECFA⁴ sice není regulačním orgánem, ale její stanoviska jsou přijímána zeměmi po celém světě [36]

3.9.1 Neurotoxicita

Dále byl zkoumán vliv na neurotoxicitu, vývoj a růst mozku, respektive důležitých proteinů pro jeho růst. Některé halogenové sloučeniny mohou způsobovat neurotoxicitu, a proto byla výzkumu podrobena i sukralóza. Důležitou vlastností v tomto ohledu je velká rozpustnost a lipofilita sukralózy, která ji významně odlišuje od jiných halogenových sloučenin a je patrně důvodem, proč sukralóza není neurotoxická. V této studii expozice sukralózy neměla vliv na hladiny proteinů důležitých pro vývoj mozku u novorozenců [41].

3.9.2 Akutní toxicita

Akutní toxicita byla testována ve studiích prováděných u hlodavců, kterým byla sukralóza podávána žaludeční sondou, což umožňuje podávat extrémně vysoké dávky. Tyto studie neprokázaly žádné nežádoucí účinky sukralózy u potkanů nebo myší, a to ani v případě nejvyšších dávek, které byly v rozmezí 10-16 g/kg tělesné hmotnosti. Toto množství sukralózy představuje zhruba dávku 7,25 kg cukru/kg hmotnosti [42]. Vzhledem k tomu, že většina vstřebané sukralózy se vylučuje stolicí, zbývá v těle pouze stopové množství. Toto množství je absorbováno a prochází tkáněmi a orgány pasivní difúzí a nakonec se vylučuje močí. Závěrem této studie byla sukralóza vyhodnocena jako netoxická, pokud je akutně podávána myším a potkanům [36].

LD₅₀ u myší je větší než 16 gramů/kg tělesné hmotnosti a větší jak 10 g/kg u potkanů [42].

⁴ JECFA-Joint Expert Committee for Food Additives

3.9.3 Dlouhodobá toxicita, genotoxicita, teratogenita

Potenciál genotoxicity byl hodnocen v širokém spektru studií prováděných za účelem zhodnocení tohoto potenciálu, ale žádné negativní účinky sukralózy nebyly zaznamenány. Stejně tak nebyly zjištěny žádné teratogenní účinky, které byly testovány po podávání dávky 1500 mg/kg a den [42].

Další studie na hlodavcích, trvající až 26 týdnů, neměly žádný vliv na karcinogenitu ani při podávání nejvyšší dávky (1500 mg/kg za den). Byla provedena též jednorozční studie u psů, kde byl též výsledek negativní. Testy na imunotoxicitu a genotoxicitu byly negativní [43].

3.9.4 Karcinogenita

Studie, která byla provedena na larvách *Drosophila melanogaster*, udává negativní potenciál karcinogenity u sukralózy, ale i dalších vysoko intenzivních sladidel (např. aspartam, sacharin, steviol-glykosidy). U těchto larev se sledoval výskyt na přítomnost nádorů (bradavic) v pokožce a nebylo zaznamenáno ani významné snížení doby přežití [44].

Autoři studie zabývající se chronickou toxicitou a karcinogenitou sukralózy uvedli, že expozice sukralózy neměla vliv na přežití, ale měla vliv na menší přírůstek hmotnosti oproti kontrolní skupině. To bylo patrně způsobeno sníženou chutností jídel, která obsahují velké množství sukralózy. U zvířat, kterým byla sukralóza podávána žaludeční sondou nedošlo k poklesu příjmu potravy. Z hlediska karcinogenity a toxicity nebyla souvislost s podáváním sukralózy a výskytem nádorů či jiných onemocnění. Závěr studie je, že sukralóza není karcinogenní [45].

Karcinogenita nebyla prokázána ani v další studii. Jednalo se o studii, která zahrnovala 50 samců a 50 samic potkanů. Sukralóza byla dávkována v koncentracích 0 %, 0,3 %, 1 % a 3 % stravy po dobu 104 týdnů. Přežití bylo srovnatelné s kontrolní skupinou a veškeré nádory, které se vyskytly, nebyly považovány za důsledek podávání sukralózy, protože ve většině případů odhadnutá doba vzniku nádorů byla ještě před začátkem studie [45].

3.9.5 Vliv na reprodukci a vývoj

Z provedených studií vyplývá, že sukralóza je bezpečná i pro těhotné ženy od počátku těhotenství a po celou dobu života. Hodnocené studie zahrnovaly i dávky stokrát vyšší než maximální odhadnuté LOD [43].

Podrobně byl studován i vliv na tvorbu spermií a plodnost obecně, jelikož některé chlorované cukry byly dřív vyhodnoceny jako potencionální antikoncepce pro muže. Protože

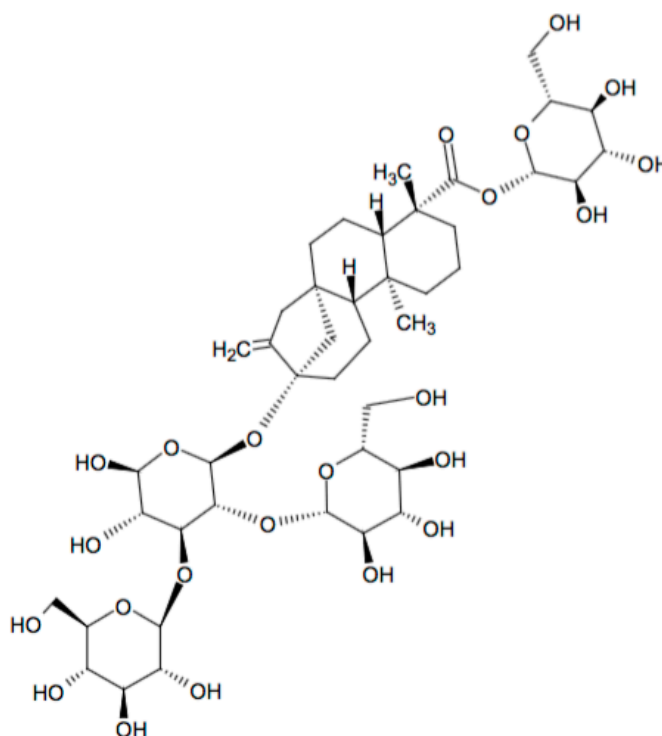
je sukralóza velmi stabilní a obtížně hydrolyzovatelná, nezpůsobuje neplodnost, ačkoliv je chlorovaným cukrem. Potencionální hrozbou jsou rozkladné produkty sukralózy, ale jak již bylo řečeno, sukralóza je velmi stabilní, k rozkladu dochází výjimečně a rozkládá se velmi malé množství látky. Testované dávky jsou navíc zhruba 300x větší než předpokládané denní množství pro konzumaci, a tak je množství rozložených produktů zanedbatelné. Po zhodnocení reprodukčních parametrů byla sukralóza vyhodnocena jako bezpečná [46].

Dle závěrů další studie, která se zabývala reprodukční toxicitou, nepředstavuje sukralóza riziko pro vývoj. Výkonost při páření, potažmo plodnost byla stejná, jako u skupiny, které byla podávána sukralóza, tak u skupiny kontrolní. Průměrný přírůstek tělesné hmotnosti mláďat, která přijímala střední a vysoké dávky, byl menší než u kontrolní skupiny. Totéž platilo i pro samice a samce, kteří byli dávkám vystaveny. Snížení hmotnosti bylo pravděpodobně způsobené menší spotřebou potravy [45].

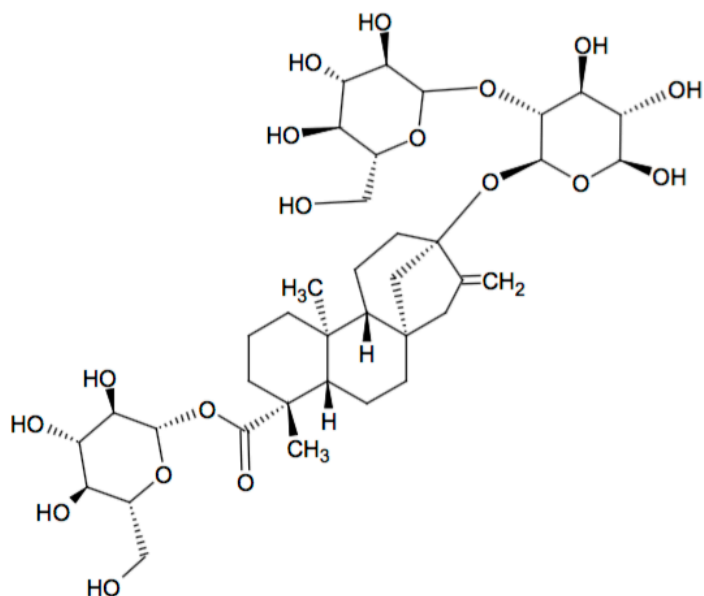
4 STEVIOL-GLYKOSIDY (E 960)

4.1 Obecné informace:

Steviol glykosidy pocházející z rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni (dále jen Stevie) jsou nyní velmi rozšířeným sladidlem, a to hlavně proto, že jsou přírodního původu. Na následujících obrázcích jsou znázorněny dva vzorce steviol-glykosidů a v tabulce jsou uvedeny jednotlivé glykosidy a jejich základní vlastnosti [47].



Obrázek 4 - Strukturální vzorec rebaudiosidu A (vlastní zpracování)



Obrázek 5 - Strukturální vzorec steviosidu (vlastní zpracování)

Tabulka 6 - Přehled steviol- glykosidů, vlastnosti steviol-glykosidů [47]

Název	CAS číslo	Vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]
Steviol	471-80-7	$C_{20}H_{30}O_3$	318,45
Steviosid	57817-89-7	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804,87
Rebaudiosid A	58543-16-1	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967,01
Rebaudiosid C	63550-99-2	$C_{44}H_{70}O_{22}$	951,01
Dulcosid A	64432-06-0	$C_{38}H_{60}O_{17}$	788,73
Rubusosid	41093-60-1	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642,73
Steviolbiosid	41093-60-1	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642,73
Rebaudiosid B	58543-17-2	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804,87
Rebaudiosid D	63279-13-0	$C_{50}H_{80}O_{28}$	1129,15
Rebaudiosid E	63279-14-1	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967,01
Rebaudiosid F	438045-89-7	$C_{43}H_{68}O_{22}$	936,99

Stevie patří mezi vysoce intenzivní sladidla přírodního původu, a proto je v dnešní době hojně využívána. Stevie byla využívána již po staletí obyvateli Guarany jako tradiční sladidlo (pro bylinné čaje a nápoje). Patří do rodiny *Asteraceae* a kmene *Eupatoriae*. Rostlina je původem z oblastí Jižní Ameriky a roste divoce v horách Amambay. Původně se jedná o malý keř, který roste v horách, a proto trvalo poměrně dlouho dobu, než byl objeven Evropany, respektive botanikem Bertonim. V oblasti Jižní Ameriky byla rostlina nazývána Caá-hê-é, což

znamená sladká bylina [48]. Chemicky ji první popsal doktor Rebaudi. Po těchto dvou objevitelích je také rostlina pojmenována *Stevia Rebaudiana* Bertoni [49].

4.2 Rostlina

Dnes nejrozšířenější rostliny mají až 80 cm vysoké lodyhy, podlouhlé vstříčné listy se zubatým okrajem a bílé drobné květy. Plodem je nažka. Semena Stevie vykazují velmi nízké procento klíčivosti. Je zde také velká variabilita populací, což má za následek velké množství důležitých vlastností, jako jsou hladiny sladkých látek a složení. Dnes je stevie pěstována v Paraguayi, Brazílii, Mexiku, Střední Americe, Kanadě, Havaji, Kalifornii, Izraeli, v Evropě potom ve Španělsku, Itálii, Belgii, ale i České republice. Listy Stevie shromažďují diterpenické glykosidy sladké chuti, známé jako steviolové glykosidy. Jejich koncentrace se značně liší v závislosti na genotypu a produkčním prostředí. Primární steviolový glykosid, steviosid, je přítomen v množstvích v rozmezí 4–20 hmotnostních procent u komerčních plodin [49].



Obrázek 6 - *Stevia rebaudiana* Bertoni, práškové sladidlo Stevie [50]

4.3 Obsahované látky:

Jak již bylo řečeno, sladká chuť je způsobena diterpenickými glykosidy entkaurenového typu, které byly poprvé izolovány již v roce 1931. Jedná se především o steviosid, kterého rostlina obsahuje až 10 % a rebaudiosid A, který je zastoupen 2-4 %. Dále je to steviobiosid, rebaudiosidy B, C, D a E a dulkosidy A a B, které jsou však zastoupeny v menším množství. Kromě těchto látek Stevie obsahuje steroidní látky např. stigmasterol, β -sitosterol, kampestreol, flavonoidy např. apigenin, luteolin, kvercerin a další fenolické látky, triterpeny,

silice, organické kyseliny a také vitaminy a minerály. Ze všech druhů rodu *Stevia* je právě *Stevia rebaudiana* Bertoni nejsladší. Sladivost těchto látek je zhruba 200-300x větší, než sladivost sacharózy [48].

4.4 Výroba

Výrobní proces zahrnuje dvě hlavní fáze:

- Extrakci vody z listů rostliny a čištění extraktu za použití iontoměničové chromatografie
- Rekrystalizaci steviol glykosidů z methanolu či vodných roztoků ethanolu

Při výrobním procesu mohou vznikat další glykosidy, které se ale nevyskytují přirozeně v rostlině a jsou důsledkem výrobního procesu. Obsah těchto glykosidů je mezi 0,1–0,37 % hmotnosti. Adsorpční kolony jsou složeny z různých částí a podle specifických vlastností kolony se mohou vyrábět směsí s různými poměry steviol-glykosidů. Počáteční dva kroky jsou následovány dalším přečištěním a opakovanou rekrystalizací a separací. Výsledkem je produkt, který obsahuje minimálně 95 % celkových steviol-glykosidů v různém poměru [51].

4.5 Analytické stanovení:

Pro stanovení steviol glykosidů, jakožto organických látek, byly vyvinuty a validovány metody HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie). Využívají se pro identifikaci steviol-glykosidů v potravinách a nápojích s alkoholem i bez alkoholu [47].

Konkrétní vyvinutá metoda pro stanovení steviolových ekvivalentů v komerčně dodávaných steviol-glykosidových směsích je metoda RP-HPLC-fluorescence (vysokoúčinná kapalinová chromatografie na nepolárních adsorbentech). Ta umožňuje přesnější stanovení celkového množství ekvivalentů steviolu přidávaného do potravin. Tato metoda může být použita na velké množství vzorků a umožňuje snadno získat přesné množství ekvivalentů steviolu přidávaného do potraviny [52].

4.6 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Předložené údaje prokázaly, že stabilita směsi steviol-glykosidů je závislá na teplotě, čase a pH [51]. Fotostabilita byla zkoumána jak v pevné, tak rozpuštěné formě ve vodě. Podle některých údajů byl Rebaudiosid A stabilnější v pH mezi 4-6 a při teplotách 5-25 °C než v podmínkách mimo toto rozmezí. Pokud jde o fotostabilitu, nebyly sledovány žádné

rozdíly mezi složením práškové (pevné) formy Reabudiosidu A vystaveného světlu a prášku uchovaného za stejných podmínek ve tmě. Rozsah rozkladu byl v této studii v rozmezí několika procent až 63 % při různých podmínkách skladování (pH, teplota, čas). Produkty degradace byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Jednalo se o příbuzné steviolové glykosidy, které se přirozeně nevyskytují v listech rostliny Stevie. Dále byl jako produkt degradace analyzován isosteviol, strukturální izomer steviolu. Po zahřátí vodného roztoku (6,5 mg/ml) rebaudiosidu A na 100 °C po dobu 48 hodin bylo zjištěno pouze 68,5 % původní koncentrace rebaudiosidu A. Jako produkty degradace byl identifikován rebaudiosid B a glukóza. Při skladování v různých teplotních podmínkách nedošlo k žádným významným změnám ve struktuře rebaudiosidu A, který byl analyzován pomocí HPLC a TLC (tenkovrstvá chromatografie) [47].

Tabulka 7 - Fyzikálně-chemické vlastnosti rebaudiosidu A [53; 54]

Fyzikální struktura	Bílý krystalický prášek
Zápach	Prakticky bez zápachu
Chuť	Intenzivně sladká, lehce nahořklá
Sladivost	250-400x vyšší než sacharóza
Kalorická hodnota	Nulová (vzhledem k dávkám v řádu µg)
Rozpustnost	1253 mg/l při 25 °C
Specifická otáčivost	$[\alpha]_{20}^D -33$ °C
Rozdělovací koeficient oktanol/voda	0,037 (20 °C)
Bod tání	210-215 °C
Molekulová hmotnost	967,021 g/mol

Stejní autoři se zabývali i stabilitou steviosidu. Jeho dlouhodobé zahřívání při 100 °C ve vodném roztoku (6,5 mg/ml) vedlo ke snížení koncentrace steviosidu. Koncentrace steviosidu klesla na 66 % po 48 hodinách a na 38,2 % po 66 hodinách. Jako produkty degradace byly identifikovány steviolbiosid a glukóza. Po uchovávání v různých teplotních podmínkách nedošlo k významným změnám v koncentraci steviosidu. V nápojích s kyselinou fosforečnou či citrónovou došlo k degradaci steviosidu, a to po uchovávání při 37 °C po dobu 4 měsíců. Koncentrace steviosidu poklesla na 74 %. V nápojích, které obsahují tyto kyseliny a fosfor (typu cola), došlo k degradaci ze 17 % [47].

4.7 Absorpce, distribuce a metabolismus

Pokud jde o metabolismus steviol glykosidů u člověka, byla analyzována směs rebaudiosidu A, steviosidu, rebaudiosidu C a dulkosidu. Jednalo se o metabolismus ve střevech, který se analyzoval pomocí LC-MS (kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem). Vzorkem byl fekální homogenát získaný od zdravých dobrovolníků. Vzorky byly získané v časech 0, 8 a 24 hodin po požití. Během 24 hodin byl metabolizován steviosid a rebaudiosid A na steviol (koncentrace 0,2 mg/ml), zatímco během této doby nebyl zjištěn metabolismus steviolu. Látky byly hydrolyzovány intestinální mikroflórou, což je v souladu s předchozími studiemi u potkanů [55].

Studie zabývající se vlivem steviol-glykosidů na složení střevní mikroflory a na transformaci rebaudiosidu A a steviosidu byla provedena za přísných anaerobních podmínek směsi fekálních bakterií od dobrovolníků (6 mužů a 5 žen) a příslušného sladidla. Hydrolyza byla sledována pomocí LC-MS. Steviosid a rebaudiosid A byly zcela hydrolyzovány na steviol během 24 hodin. Steviosid ani rebaudiosid A významně neovlivnily složení střevní mikroflory [56].

Vstřebávání bylo testováno na zvířatech, kteří měli zavedenou sondu. Tento test ukázal, že vstřebávání radioaktivně značeného steviolu probíhá u potkanů v tenkém střevě. Metabolismus byl sledován u radioaktivně značeného steviosidu. Potkanům byla podávána dávka 125 mg/kg. Koncentrace v krvi se pomalu zvyšovala na maximálně 4,83 μg steviosidových ekvivalentů na ml (po osmi hodinách) a vykazovala biologický poločas⁵ 24 hodin. Po jedné hodině byly nejvyšší koncentrace sledovány v tomto pořadí v následujících orgánech: tenké střevo, žaludek a slepé střevo. Po čtyřech hodinách byla nejvyšší koncentrace v cévách, a to výrazně než v jiných tkáních. Po 45 hodinách byla koncentrace původní látky v těle 30,7 %. Po 120 hodinách bylo stolicí vyloučeno 68,4 % látek a 23,9 % látek bylo vyloučeno vydechovaným vzduchem, zatímco močí bylo vyloučeno pouze 2,3 %. Z exkrece žlučníku a stolice byl vyvozen závěr, že v těle dochází k enterohepatálním oběhům. TLC analýza ukázala, že steviosid je metabolizován střevní mikroflórou na steviol a cukry, tyto látky jsou absorbovány ze slepého střeva, distribuovány po těle a vylučovány hlavně do výkalů a vydechovaného vzduchu [58].

V další studii na potkanech nebylo zjištěno vychytávání steviosidu gastrointestinálním traktem a množství, které by proniklo, bylo pod hranicí detekce (200 ng/ml). Jako hlavní

⁵ Biologický poločas je čas, který je potřebný ke ztrátě poloviční farmakologické, fyziologické či radiologické aktivity látky [57].

metabolit v plasmě byl stanoven volný steviol, který dosáhl maximální koncentrace po 24 hodinách po podání. V játrech byl poté steviol konjugován s kyselinou glukoronovou a metabolitem byl prokázán steviol glukoronid, který byl převážně vylučován močí během následujících 72 hodin. Nebyly nalezeny žádné látky metabolismu, které by byly mutagenní. U lidí je hlavním metabolitem v plasmě steviol glukoronid, na rozdíl od volného steviolu u potkanů [59].

4.8 Zdravotní rizika

ADI pro glykosidy steviolu bylo stanoveno na 4 mg/kg tělesné hmotnosti a den. V roce 2008 vydala AFSSA⁶ prohlášení, že použití rebaudiosidu A extrahovaného z rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni s čistotou větší než 97 % nepředstavuje zdravotní riziko pro spotřebitele [47].

4.8.1 Akutní toxicita

Studie akutní orální toxicity se steviosidem ukázaly LD > 15 g/kg hmotnosti u myši, krys a křečka [47].

4.8.2 Krátkodobá a subchronická toxicita

V následujících studiích byl steviol-glykosid podáván potkanům v koncentracích do 100 000 mg/kg stravy ve čtyřtýdenní studii (10 zvířat pro každé pohlaví), kde dávky činily 0, 12 000, 25 000 a 50 000 mg/kg stravy a dále v devadesátidenní studii toxicity (20 zvířat pro každé pohlaví). V těchto studiích nebyly zjištěny žádné případy úmrtí, toxicity či změny v hematologických či klinických vyšetřeních. Výjimkou byl vliv na tělesnou hmotnost a příjem krmiva. V devadesátidenní studii byl nárůst hmotnosti významně nižší u potkanů, kteří dostávali dávku 25 000 a 50 000 mg/kg krmiva rebaudiosidu A. Po čtyřech dnech po ukončení podávání dávky bylo zvýšení hmotnosti významně nižší u všech potkanů oproti kontrolní skupině. Přírůstek hmotnosti byl dle autorů snížen kvůli snížené sensorické kvalitě podávané potravy se steviol-glykosidy [47].

V jiné studii byl rebaudiosid A podáván krysám ve stravě po dobu 90 dní v dávkách 0, 500, 1000 nebo 2000 mg/kg tělesné hmotnosti. V těchto dávkách nebyl zaznamenán žádný vliv

⁶ AFSSA – Agence française de sécurité sanitaire des aliments

na přírůstek hmotnosti. Nebyly zjištěny ani patologie v klinických či hematologických vyšetřeních [60].

Studie z roku 2017, která byla též devadesátidenní se zabývala orální toxicitou. V této studii nebyly zaznamenány žádné významné vlivy steviol-glykosidů na toxicitu [61].

4.8.3 Genotoxicita

Studie genotoxicity byla provedena na myších, a to prostřednictvím podávání rebaudiosidu A v dávkách 500–2000 mg/kg tělesné hmotnosti po dobu dvou dní. Výsledkem byl negativní vliv na genotoxicitu. Stejně tak byl negativní výsledek při studiu vlivu steviol-glykosidů na poškození DNA. Novější studie udávala údajný vliv na vlastnosti DNA, ovšem testovaná skupina byla velmi malá a nebyly dostatečné důkazy pro průkaz spojitosti mezi konzumací steviol-glykosidů a vlastnostmi DNA. Některé studie udávají, že steviol a jeho oxidační deriváty testované *in vitro* jsou genotoxické, avšak studie *in vivo* prokázaly opak, a to i ve vysokých testovaných dávkách (až 8000 mg/kg hmotnosti) [47].

Novější studie též uvádí negativní vliv na genotoxicitu, která byla testována na myších. V této studii byly extrakty *Stevia rebaudiana* Bertoni testovány taktéž *in vitro* s negativním výsledkem. Testovanou bakterií byla *Salmonella typhimurium* [61].

I další studie, které byly provedeny od roku 2008 udávají negativní výsledky testů na genotoxicitu. Jednalo se o testy *in vitro* či testy chromozomové aberace savců. V těchto studiích byly vyhodnoceny jako ohrožené genotoxicitou tkáně jater. Ty byly proto důkladně analyzovány po podávání různých dávek rebaudiosidu A, avšak s negativním výsledkem [62].

4.8.4 Karcinogenita

Studie karcinogenity byly EFSA vyhodnoceny s negativním výsledkem. Dvě uvedené studie nebyly relevantní, jelikož dle vyjádření JECFA nebyly testy prováděny specifikovanými steviol-glykosidy. Další studie již byla prováděna specifikovanými steviol-glykosidy na krysách. Krysám byla po dobu 104 týdnů podávána dávka 0 (kontrola), 1,25 či 2,5 g/kg hmotnosti a den steviosidu. Během studie nebyly sledovány změny v době přežití, ale vyskytlo se několik nádorů. To však autoři nedávají do souvislosti s konzumací steviol-glykosidů, jelikož daný druh krys je náchylný na výskyt nádorů [47].

Novější studie, která byla provedena na larvách *Drosophila melanogaster*, udává též negativní potenciál karcinogenity u steviol-glykosidů. Jednalo se o studii, která byla uvedena již ve studiích karcinogenity sukralózy [44].

4.8.5 Reprodukční toxicita

Studie na reprodukční toxicitu byly vždy prováděny jako vícegenerační. Konkrétně byl potkanům (F0 generace) podáván steviol-glykosid v dávkách 0, 7 500, 12 500 a 25 000 mg/kg stravy. Tato dávka odpovídá zhruba 2048 a 2567 mg/kg hmotnosti a den pro nejvyšší koncentrace. Potkanům byla tato dávka podávána 10 týdnů před pářením. Samicím i během doby březosti a laktace. Z generace F1 byli někteří potkani pitváni a ostatní byli další rodičovskou generací. V generaci F0 a F1 nebylo zaznamenáno úmrtí či klinické příznaky toxicity. Byl zaznamenán snížený přírůstek hmotnosti u potkanů, kteří dostávali dávku 12 500 a 25 000 mg/kg a den. Nebyly prokázány ani účinky na reprodukci (koncentrace spermií, fertilita, výkonnost při páření). Stejný závěr platil i pro další generaci F2 [47].

V další studii byli testováni březí králíci, kterým byla podávány různé dávky steviol-glykosidů (0, 350, 700 a 1400 mg/kg hmotnosti a den). Zvířata byla hodnocena z hlediska klinických vyšetření a také byly hodnoceny plody samic, které byly usmrceny během studie. U vysokých dávek byl zaznamenán nízký přírůstek hmotnosti společně se sníženým příjmem potravy. Vyskytlo se i několik případů úmrtí a zhoršení klinického obrazu, což ale autoři přisuzují náchylnosti králíků na poruchy trávicího traktu [47].

Jedna z novějších studií zabývající se podáváním steviol-glykosidů a vlivem na reprodukivitu udává jistý vliv na vaječníky, ale studie není relevantní a k vyvození závěru je zapotřebí provést další studie [63].

Studie z roku 2016, která se zabývala vlivem steviol-glykosidů na hladinu progesteronu u žen udává, že steviol-glykosidy, potažmo steviol, může mít vliv na tvorbu progesteronu, který ovlivňuje reprodukční cyklus u žen [64].

4.8.6 Alergenicitá

Vyskytlo se několik případů, ve kterých byla zaznamenána reakce na steviol-glykosidy. Reakce byla potvrzena kožními testy. Po těchto případech byla alergenicitá testována na 200 dětech ve věku čtyř měsíců až dvou let (pro každou skupinu 50 dětí). U zdravých dětí se nevyskytla žádná reakce, u dětí s alergickou rýmou reagovalo na kožní test pozitivně 26 % dětí, s bronchiálním astmatem 34 % dětí a s atopickým ekzémem 64 % dětí. Po dvouměsíční pauze byl test proveden znovu a reaktivita se velmi snížila. Vzhledem k tomu, že reagovaly pozitivně děti, které již měly alergický problém, je pravděpodobné, že steviol-glykosidy obsahují některé zkříženě reagující rostlinné antigeny z čeledi *Asteraceae* [47].

Novější studie alergenicity probíhala čtyři roky prostřednictvím zpráv o pozitivních reakcích na sladidlo značky Truvia, které je kombinací erythritolu (který má velmi malý alergenní potenciál) a steviol-glykosidů. Zprávy o pozitivních reakcích na toto sladidlo byly velmi vzácné (1,1 případu na 10 milionů porcí), proto lze usoudit, že alergenní potenciál steviol-glykosidů je minimální [65].

4.9 Pozitivní vliv na zdraví

Na rozdíl od předchozích sladidel je rostlina *Stevia rebaudiana* Bertoni, případně extrakt z rostliny, steviol-glykosidy, zkoumán pro léčivé účinky. V tradiční medicíně byla používána již Indiány kmene Gaurani k léčbě diabetu, vysokého krevního tlaku, nadváhy, průjmu, kožních problémů a potíží zažívacího traktu [48].

Studie z roku 2013 se zabývala účinkem extraktu *Stevia rebaudiana* Bertoni na hojení ran. Studie byla prováděna na myších, kterým byla vytvořena rána na hřbetu, a poté jim byla podávána dávka extraktu. Na rozdíl od kontrolní skupiny došlo k rychlejšímu hojení rány [66].

Dalším pozitivním účinkem je antidiabetický účinek, za který je zodpovědný především steviol a steviosid. Díky těmto látkám je snižována hladina glukózy v krvi a zvyšována sekrece inzulínu v β -buňkách pankreatu, a tím pádem i hladina inzulínu v krvi. Tento jev byl testován i na zvířatech, u kterých byl uměle vyvolán diabetes. U těchto zvířat došlo navíc ke zlepšení funkce ledvin a snížení váhy [67].

Jak již bylo uvedeno v úvodu této kapitoly, stevie obsahuje řadu látek, které mají antioxidační účinek. Například flavonoidy a další fenolické látky, ale i samotný steviol a jeho glykosidy. Flavonoidy vychytávají volné radikály a snižují oxidativní stres, čímž chrání buňky před poškozením. Rebaudiosid A a C a dulcosid A měly v experimentu na myších též protizánětlivý účinek [48].

5 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na vybraná náhradní sladidla, jejich vlastnosti a vliv na zdraví. Nejprve jsem popsala jednotlivá sladidla, jejich produkty rozkladu a metabolismus v těle. Stručně jsem se snažila vystihnout i výrobu a analytické stanovení či použití.

Dále jsem popsala zdravotní rizika sladidel, která jsou uvedena v odborných člancích EFSA a rozšířila je o novější studie či přidala další, které se zabývaly hodnocením bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti. Vzhledem k tomu, že jsou všechna zmíněná sladidla povolena v převážné většině zemí světa, jsou v těchto zemích hodnocena jako zdravotně nezávadná. Testovaná množství na zvířatech jsou ve většině studií desetinásobky ADI, což může vést k tomu, že se u testovaných zvířat vyskytnou zdravotní komplikace. Ve většině případů jsou sladidla hodnocena jako zdravotně nezávadná. Nejvíce studií se zabývá hodnocením aspartamu, pravděpodobně z důvodu dlouhého výskytu na trhu a mediální propagace jeho údajné závadnosti. Naopak extrakty rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni jsou studovány pro své pozitivní účinky na zdraví.

Dle mého názoru jsou sladidla bezpečná, obzvláště pokud jsou konzumována v množstvích, u kterých je prokázáno, že nemají negativní vliv na lidské zdraví (ADI).

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] KLESCHT, Vladimír, Iva HRNČIŘÍKOVÁ a Lucie MANDELOVÁ. *Éčka v potravinách*. Brno: Computer Press, 2006. ISBN 978-80-251-1292-2.
- [2] ČESKO. Vyhláška č. 4/2008 ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2008, částka 3, s. 258.
- [3] ES. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2008, částka L 354, s. 16.
- [4] ČESKO. Vyhláška č. 304/2004 ze dne 18.5. 2004, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2004, částka 100.
- [5] VRBOVÁ, Tereza. *Víme, co jíme?, aneb, Průvodce „Éčky“ v potravinách*. Praha: EcoHouse, 2001. ISBN 978-80-238-7504-1.
- [6] NUTRITION, Center for Food Safety and Applied. *Food Additives & Ingredients - Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States* [online]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm#SummaryTable>.
- [7] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [8] PUBCHEM. *Aspartame* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/134601>.
- [9] EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *EFSA Journal*. 2013, **11**(12). DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3496. ISSN 18314732.
- [10] INGLETT, G. E. a AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. *Symposium: sweeteners*. Westport, Conn: AVI Pub. Co, 1974. ISBN 978-0-87055-153-6.
- [11] PATTANAARGSON, S., C. CHUAPRADIT a S. SRISUKPHONRARUK. Aspartame Degradation in Solutions at Various pH Conditions. *Journal of Food Science*. 2001, **66**(6), 808–809. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15177.x. ISSN 0022-1147.

- [12] CHENG, Cheanyeh a Shing-Chen WU. Simultaneous analysis of aspartame and its hydrolysis products of Coca-Cola Zero by on-line postcolumn derivatization fluorescence detection and ultraviolet detection coupled two-dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(20), 2976–2983. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.03.033. ISSN 00219673.
- [13] EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA Journal*. 2012, **10**(12). DOI: 10.2903/j.efsa.2012.3020. ISSN 18314732.
- [14] MAGNUSON, B. A., G. A. BURDOCK, J. DOULL, R. M. KROES, G. M. MARSH, M. W. PARIZA, P. S. SPENCER, W. J. WADDELL, R. WALKER a G. M. WILLIAMS. Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. *Critical Reviews in Toxicology*. 2007, **37**(8), 629–727. DOI: 10.1080/10408440701516184. ISSN 1040-8444.
- [15] RENCÜZOĞULLARI, Eyyüp, Berrin Ayaz TÜYLÜ, Mehmet TOPAKTAŞ, Hasan Basri İLA, Ahmet KAYRALDIZ, Mehmet ARSLAN a Songül Budak DILER. Genotoxicity of Aspartame. *Drug and Chemical Toxicology*. 2004, **27**(3), 257–268. DOI: 10.1081/DCT-120037506. ISSN 0148-0545.
- [16] YILMAZ, Serkan a Aslı UÇAR. A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not? *Cytotechnology*. 2014, **66**(6), 875–881. DOI: 10.1007/s10616-013-9681-0. ISSN 0920-9069.
- [17] SASAKI, Yu F, Satomi KAWAGUCHI, Asako KAMAYA, Miyuki OHSHITA, Kazumi KABASAWA, Kayoko IWAMA, Kazuyuki TANIGUCHI a Shuji TSUDA. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002, **519**(1–2), 103–119. DOI: 10.1016/S1383-5718(02)00128-6. ISSN 13835718.
- [18] OTABE, Akira, Fumio OHTA, Asuka TAKUMI a Barry LYNCH. Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2018. DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.01.023. ISSN 02732300.
- [19] KIRKLAND, David a David GATEHOUSE. “Aspartame: A review of genotoxicity data”. *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **84**, 161–168. DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.021. ISSN 02786915.

- [20] SOFFRITTI, Morando, Fiorella BELPOGGI, Davide Degli ESPOSTI, Luca LAMBERTINI, Eva TIBALDI a Anna RIGANO. First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administered in the Feed to Sprague-Dawley Rats. *Environmental Health Perspectives*. 2005, **114**(3), 379–385. DOI: 10.1289/ehp.8711. ISSN 0091-6765.
- [21] VON POSER TOIGO, E., A.P. HUFFELL, C.S. MOTA, D. BERTOLINI, L.F. PETTENUZZO a C. DALMAZ. Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame. *Appetite*. 2015, **87**, 168–174. DOI: 10.1016/j.appet.2014.12.213. ISSN 01956663.
- [22] SOFFRITTI, Morando, Fiorella BELPOGGI, Marco MANSERVIGI, Eva TIBALDI, Michelina LAURIOLA, Laura FALCIONI a Luciano BUA. Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine*. 2010, **53**(12), 1197–1206. DOI: 10.1002/ajim.20896. ISSN 02713586.
- [23] ARAÚJO, João Ricardo, Fátima MARTEL a Elisa KEATING. Exposure to non-nutritive sweeteners during pregnancy and lactation: Impact in programming of metabolic diseases in the progeny later in life. *Reproductive Toxicology*. 2014, **49**, 196–201. DOI: 10.1016/j.reprotox.2014.09.007. ISSN 08906238.
- [24] JANSSEN, P.J.C.M. a C.A. VAN DER HEIJDEN. Aspartame: Review of recent experimental and observational data. *Toxicology*. 1988, **50**(1), 1–26. DOI: 10.1016/0300-483X(88)90117-5. ISSN 0300483X.
- [25] TAUCHER, J., A. LAGG, A. HANSEL, W. VOGEL a W. LINDINGER. Methanol in Human Breath. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1995, **19**(5), 1147–1150. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1995.tb01593.x. ISSN 0145-6008.
- [26] Glutathion. *celostnimedica* [online]. Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/glutathion.htm>.
- [27] FINAMOR, Isabela, Salvador PÉREZ, Caroline A. BRESSAN, Carlos E. BRENNER, Sergio RIUS-PÉREZ, Patricia C. BRITTES, Gabriele CHEIRAN, Maria I. ROCHA, Marcelo DA VEIGA, Juan SASTRE a Maria A. PAVANATO. Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway, glutathione depletion and liver damage in mice. *Redox Biology*. 2017, **11**, 701–707. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.019. ISSN 22132317.

- [28] ENGLUND-ÖGGE, Linda, Anne Lise BRANTSÆTER, Margareta HAUGEN, Verena SENGPIEL, Ali KHATIBI, Ronny MYHRE, Solveig MYKING, Helle Margrete MELTZER, Marian KACEROVSKY, Roy M NILSEN a Bo JACOBSSON. Association between intake of artificially sweetened and sugar-sweetened beverages and preterm delivery: a large prospective cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012, **96**(3), 552–559. DOI: 10.3945/ajcn.111.031567. ISSN 0002-9165.
- [29] MASLOVA, Ekaterina, Marin STRØM, Sjurdur F. OLSEN a Thorhallur I. HALLDORSSON. Consumption of Artificially-Sweetened Soft Drinks in Pregnancy and Risk of Child Asthma and Allergic Rhinitis. *PLoS ONE*. 2013, **8**(2), 57261. DOI: 10.1371/journal.pone.0057261. ISSN 1932-6203.
- [30] LINDSETH, Glenda N., Sonya E. COOLAHAN, Thomas V. PETROS a Paul D. LINDSETH. Neurobehavioral Effects of Aspartame Consumption: EFFECTS OF ASPARTAME CONSUMPTION. *Research in Nursing & Health*. 2014, **37**(3), 185–193. DOI: 10.1002/nur.21595. ISSN 01606891.
- [31] MOLINARY, Samuel V. a Mary E. QUINLAN. Sucralose. In: Kay O'DONNELL a Malcolm W. KEARSLE. *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012, s. 167–183. DOI: 10.1002/9781118373941.ch8. ISBN 978-1-118-37394-1.
- [32] GRENBY, T. H. *Advances in Sweeteners*. Boston, MA: Springer US, 1996. ISBN 978-1-4613-1229-1.
- [33] PUBCHEM. *Sucralose* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71485>.
- [34] BELLO, Nicholas T. a Andras HAJNAL. Male rats show an indifference-avoidance response for increasing concentrations of the artificial sweetener sucralose. *Nutrition Research*. 2005, **25**(7), 693–699. DOI: 10.1016/j.nutres.2005.07.003. ISSN 02715317.
- [35] BARNDT, R.L. a G. JACKSON. Stability of Sucralose in baked goods. 1990, **44**(1), 62–66. ISSN 0015-6639.
- [36] MAGNUSON, Bernadene A., Ashley ROBERTS a Earle R. NESTMANN. Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, **106**, 324–355. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.047. ISSN 02786915.
- [37] WIET, Stephan G. a Pamela K. BEYTS. Sensory Characteristics of Sucralose and other High Intensity Sweeteners. *Journal of Food Science*. 1992, **57**(4), 1014–1019. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1992.tb14345.x. ISSN 0022-1147.

- [38] NABORS, Lyn O'Brien. *Alternative sweeteners*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, 2001. Food science and technology, 112. ISBN 978-0-8247-0437-7.
- [39] BOWEN, W.H., D.A. YOUNG a S.K. PEARSON. The Effects of Sucralose on Coronal and Root-surface Caries. *Journal of Dental Research*. 1990, **69**(8), 1485–1487. DOI: 10.1177/00220345900690080701. ISSN. 1544-0591.
- [40] BAIRD, I.McLean, N.W. SHEPHARD, R.J. MERRITT a G. HILDICK-SMITH. Repeated dose study of sucralose tolerance in human subjects. *Food and Chemical Toxicology*. 2000, **38**, 123–129. DOI: 10.1016/S0278-6915(00)00035-1. ISSN 02786915.
- [41] VIBERG, Henrik a Anders FREDRIKSSON. Neonatal exposure to sucralose does not alter biochemical markers of neuronal development or adult behavior. *Nutrition*. 2011, **27**(1), 81–85. DOI: 10.1016/j.nut.2009.10.007. ISSN 08999007.
- [42] GROTZ, V. Lee a Ian C. MUNRO. An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009, **55**(1), 1–5. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.05.011. ISSN 02732300.
- [43] BRUSICK, D., V.L. GROTZ, R. SLESINSKI, C.L. KRUGER a A.W. HAYES. The absence of genotoxicity of sucralose. *Food and Chemical Toxicology*. 2010, **48**(11), 3067–3072. DOI: 10.1016/j.fct.2010.07.047. ISSN 02786915.
- [44] VASCONCELOS, Mirley Alves, Priscila Capelari ORSOLIN, Rosiane Gomes SILVA-OLIVEIRA, Júlio César NEPOMUCENO a Mário Antônio SPANÓ. Assessment of the carcinogenic potential of high intense-sweeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 2017, **101**, 1–7. DOI: 10.1016/j.fct.2016.12.028. ISSN 02786915.
- [45] MANN, S.W, M.M YUSCHAK, S.J.G AMYES, P AUGHTON a J.P FINN. A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2000, **38**, 71–89. DOI: 10.1016/S0278-6915(00)00029-6. ISSN 02786915.
- [46] KILLE, J.W., W.C.L. FORD, P. MCANULTY, J.M. TESH, F.W. ROSS a C.R. WILLOUGHBY. Sucralose: lack of effects on sperm glycolysis and reproduction in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2000, **38**, 19–29. DOI: 10.1016/S0278-6915(00)00025-9. ISSN 02786915.
- [47] EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (ANS). Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive: Safety of steviol glycosides as a food additive. *EFSA Journal*. 2010, **8**(4), 1537. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1537. ISSN 18314732.

- [48] NAVRÁTILOVÁ, Z. Stevia rebaudiana - přírodní nekalorické sladidlo [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2015/06/09.pdf>
- [49] PURI, Munish, Deepika SHARMA a Ashok K. TIWARI. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*. 2011, **29**(6), 781–791. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.006. ISSN 07349750.
- [50] *Stevia in ice cream* [online]. Dostupné z: <http://icecreamscience.com/stevia-ice-cream/>
- [51] EFSA PANEL ON FOOD ADDITIVES AND NUTRIENT SOURCES ADDED TO FOOD (EFSA ANS PANEL), Maged YOUNES, Peter AGGETT, Fernando AGUILAR, Riccardo CREBELLI, Birgit DUSEMUND, Metka FILIPIČ, Maria Jose FRUTOS, Pierre GALTIER, Ursula GUNDERT-REMY, Gunter Georg KUHNLE, Claude LAMBRÉ, Jean-Charles LEBLANC, Inger Therese LILLEGAARD, Peter MOLDEUS, Alicja MORTENSEN, Agneta OSKARSSON, Ivan STANKOVIC, Ine WAALKENS-BERENDSEN, Rudolf Antonius WOUTERSEN, Matthew WRIGHT, Paul TOBBACK, Ana Maria RINCON, Camilla SMERALDI a David GOTT. Safety of the proposed amendment of the specifications of the food additive steviol glycosides (E 960). *EFSA Journal*. 2018, **16**(3). DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5236. ISSN 18314732.
- [52] BARTHOLOMEES, Uria, Tom STRUYF, Olivier LAUWERS, Stijn CEUNEN a Jan M.C. GEUNS. Validation of an HPLC method for direct measurement of steviol equivalents in foods. *Food Chemistry*. 2016, **190**, 270–275. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.102. ISSN 03088146.
- [53] PUBCHEM. *Rebaudioside A* [online]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6918840>.
- [54] The Merck Index Online. *Rebaudiosides* [online]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m9513?q=unauthorize>.
- [55] KOYAMA, E, K KITAZAWA, Y OHORI, O IZAWA, K KAKEGAWA, A FUJINO a M UI. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, **41**(3), 359–374. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00235-1. ISSN 02786915.
- [56] GARDANA, Claudio, Paolo SIMONETTI, Enrica CANZI, Raffaella ZANCHI a Piergiorgio PIETTA. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Extracts by Human Microflora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(22), 6618–6622. DOI: 10.1021/jf0303619. ISSN 0021-8561.
- [57] Velký lékařský slovník On-Line. *polocas, biologický*. [online]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/polocas-biologicky>.

- [58] NAKAYAMA, Kunio, Daigo KASAHARA a Fumihiro YAMAMOTO. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Stevioside in Rats. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 1986, **27**(1), 1-81. DOI: 10.3358/shokueishi.27.1. ISSN 0015-6426.
- [59] WHEELER, A., A.C. BOILEAU, P.C. WINKLER, J.C. COMPTON, I. PRAKASH, X. JIANG a D.A. MANDARINO. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, **46**(7), 54–60. DOI: 10.1016/j.fct.2008.04.041. ISSN 02786915.
- [60] NIKIFOROV, Andrey I a Alex K EAPEN. A 90-Day Oral (Dietary) Toxicity Study of Rebaudioside A in Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Toxicology*. 2008, **27**(1), 65–80. DOI: 10.1080/10915810701876752. ISSN 1091-5818.
- [61] ZHANG, Qiannan, Hui YANG, Yongning LI, Haibo LIU a Xudong JIA. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017, **86**, 253–259. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.03.021. ISSN 02732300.
- [62] URBAN, J.D., M.C. CARAKOSTAS a D.J. BRUSICK. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient? *Food and Chemical Toxicology*. 2013, **51**, 386–390. DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.016. ISSN 02786915.
- [63] JIANG, Jingle, Lina QI, Quanwei WEI a Fangxiong SHI. Effects of daily exposure to saccharin sodium and rebaudioside A on the ovarian cycle and steroidogenesis in rats. *Reproductive Toxicology*. 2018, **76**, 35–45. DOI: 10.1016/j.reprotox.2017.12.006. ISSN 08906238.
- [64] SHANNON, Maeve, Anders REHFELD, Caroline FRIZZELL, Christina LIVINGSTONE, Caoimhe MCGONAGLE, Niels E. SKAKKEBAEK, Ewa WIELOGÓRSKA a Lisa CONNOLLY. In vitro bioassay investigations of the endocrine disrupting potential of steviol glycosides and their metabolite steviol, components of the natural sweetener *Stevia*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016, **427**, 65–72. DOI: 10.1016/j.mce.2016.03.005. ISSN 03037207.
- [65] URBAN, Jonathan D., Michael C. CARAKOSTAS a Steve L. TAYLOR. Steviol glycoside safety: Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens? *Food and Chemical Toxicology*. 2015, **75**, 71–78. DOI: 10.1016/j.fct.2014.11.011. ISSN 02786915.
- [66] DAS, Kuntal. Wound healing potential of aqueous crude extract of *Stevia rebaudiana* in mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013, **23**(2), 351–357. DOI: 10.1590/S0102-695X2013005000011. ISSN 0102695X.

[67] MOHD-RADZMAN, Nabilatul Hani, W. I. W. ISMAIL, Zainah ADAM, Siti Safura JAAPAR a Aishah ADAM. Potential Roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, **2013**, 1–10. DOI: 10.1155/2013/718049. ISSN 1741-427X.