

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití nových stacionárních fází v analýze umělých sladidel
Bc. Petr Listík

Diplomová práce
2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr Listík**
Osobní číslo: **C19486**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Využití nových stacionárních fází v analýze umělých sladidel**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zabývající se analýzou umělých sladidel v potravinách. Zaměřte se na využití různých chromatografických systémů pro jejich separaci. Dále se věnujte extrakčním technikám vhodným pro potravinářské vzorky.
2. Na základě literární rešerše vyberte vhodný chromatografický systém a vhodnou stacionární fázi pro separaci vybraných sladidel. Optimalizujte chromatografickou separaci s využitím standardů vybraných sladidel.
3. Optimalizovanou metodu využijte pro analýzu reálných vzorků.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jitka Klikarová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití nových stacionárních fází v analýze umělých sladidel jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Petr Listík v. r.

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za podporu, odborné rady, pomoc a čas strávený během vypracování této diplomové práce.

V neposlední řadě také děkuji rodině za jejich důvěru a podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato práce se zabývá analýzou umělých sladidel v potravinách. Teoretická část obsahuje charakterizaci sacharidů, umělých sladidel a jejich zdravotní rizika. Následně jsou popisovány vybraná umělá sladidla a jejich alternativy. Další část je zaměřena na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve stanovení umělých sladidel ve vzorcích potravin. Experimentální část práce je věnována optimalizaci HPLC/MS podmínek separace směsi standardů a zjištění retenčního chování jednotlivých sladidel. Optimalizovaná metoda byla následně použita pro stanovení umělých sladidel v potravinářských výrobcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Umělá sladidla, HPLC/MS, Analýza potravin, Aspartam, Acesulfam, Cyklamát, Sacharin, Sukralóza

TITLE

New stationary phases in the analysis of artificial sweeteners

ANNOTATION

This work deals with the analysis of artificial sweeteners in food. The theoretical part contains the characterization of carbohydrates, artificial sweeteners and their health risks. Subsequently, selected artificial sweeteners and their alternatives are described. The next part is focused on determination of artificial sweeteners in food samples using high performance liquid chromatography. The experimental part of the work is devoted to the optimization of HPLC/MS separation conditions and determination of the retention behavior of individual sweeteners. The optimized method was subsequently used for the determination of artificial sweeteners in food products.

KEYWORDS

Artificial sweeteners, HPLC/MS, Food analysis, Aspartame, Acesulfame, Cyclamate, Saccharin, Sucralose

Obsah

Úvod.....	10
1 Sacharidy	11
1.1 Rozdělení sacharidů	12
1.2 Metabolismus sacharidů	14
1.2.1 Cukrovka a inzulínová rezistence	16
1.2.2 Glykemický index sacharidů a další ukazatele	17
1.2.3 Fruktóza a její škodlivost	21
2 Umělá sladidla	22
2.1 Zdravotní rizika	24
2.2 Dělení umělých sladidel	26
2.2.1 Nevýživová umělá sladidla	26
2.2.2 Výživová umělá sladidla	33
2.3 Alternativy umělých sladidel	33
3 Metody analýzy umělých sladidel v potravinách	36
3.1 Úprava vzorku před analýzou	36
3.1.1 Extrakce	36
3.1.2 Extrakce tuhou fází	37
3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	39
3.2.1 Fázové systémy v HPLC	40
3.2.2 Detekce	42
3.2.3 Kvantifikace	44
3.3 Analýza umělých sladidel metodou HPLC	45
4 Experimentální část	48
4.1 Použité přístroje a zařízení	48
4.2 Použité chemikálie	48
4.2.1 Standardy sladidel	49
4.3 Použité vzorky	49
4.4 Pracovní postup	51
4.4.1 Mobilní fáze	51
4.4.2 Úprava vzorků	51
4.5 HPLC/MS podmínky	52
4.6 Vyhodnocení dat	54
5 Výsledky a diskuze	55
5.1 Retenční chování umělých sladidel	55
5.1.1 Vliv obsahu ACN v mobilní fázi	55
5.1.2 Vliv pH pufry	58
5.1.3 Vliv koncentrace pufry	60
5.2 Analýza umělých sladidel ve vzorcích potravin	63
5.2.1 Kalibrační měření	64
5.2.2 Kvantitativní stanovení umělých sladidel v reálných vzorcích	65
5.3 Validace metody	67
5.3.1 Návratnost metody	67
5.3.2 Opakovatelnost metody	68
6 Závěr	69
7 Použitá literatura	70
Přílohy	81

Seznam tabulek

Tabulka 1: Energetické hodnoty živin [1, 2, 7, 8]	12
Tabulka 2: Základní funkce a zdroje sacharidů [2]	12
Tabulka 3: Nutriční hodnoty sacharidů a vlákniny ve 100 g vybraných potravin [2, 5]	13
Tabulka 4: Průměrné zásoby energie v organismu [2]	15
Tabulka 5: Glykemický index různých kombinací potravin [19].....	20
Tabulka 6: Porovnání slazených nápojů a jejich variant bez cukru [36, 37]	23
Tabulka 7: Podmínky měření na kapalinovém chromatografu s MS detekcí – režim SIM.....	53
Tabulka 8: Podmínky měření na kapalinovém chromatografu s MS detekcí - režim MRM....	53
Tabulka 9: Křivková rovnice, významnost absolutního členu a směrodatná odchylka jednotlivých koeficientů	64
Tabulka 10: Koncentrační rozsah, koeficienty determinace, LOD a LOQ	64
Tabulka 11: Koncentrace umělých sladidel v kapalných vzorcích.....	66
Tabulka 12: Koncentrace umělých sladidel v pevných vzorcích	66
Tabulka 13: návratnost metody	67
Tabulka 14: Intradenní a mezidenní opakovatelnost	68

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Glykemická křivka [18]	18
Obrázek 2: Chemická struktura acesulfamu K [75].....	26
Obrázek 3: Chemická struktura aspartamu [75]	27
Obrázek 4: Chemická struktura neotamu [75].....	28
Obrázek 5: Chemická struktura sacharinu [75]	28
Obrázek 6: Chemická struktura sukralózy [75]	29
Obrázek 7: Chemická struktura kyseliny cyklamové [75].....	29
Obrázek 8: Chemická struktura steviosidu [75]	30
Obrázek 9: Chemická struktura advantamu [75]	32
Obrázek 10: Chemická struktura alitamu [75].....	32
Obrázek 11: Schéma extrakce na pevné fázi (SPE) [130]	38
Obrázek 12: Schéma kapalinového chromatografu [138]	39
Obrázek 13: Ionizace elektrosprejem [138].....	47
Obrázek 14: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující HCOONH ₄ (c = 10 mmol/l, pH=5)	56
Obrázek 15: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující CH ₃ COONH ₄ (c = 10 mmol/l, pH=5).....	57
Obrázek 16: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l HCOONH ₄ a ACN s obsahem 70%	58
Obrázek 17: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l CH ₃ COONH ₄ a ACN s obsahem 70%	59
Obrázek 18: Závislost retenčního faktoru aspartamu na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l AcNH ₄ a ACN s obsahem 70-90%	59
Obrázek 20: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 75% ACN.....	60
Obrázek 21: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN s přidavkem a bez přidavku pufru v mobilní fázi obsahující CH ₃ COONH ₄ (c = 10 mmol/l, pH=5).....	61
Obrázek 22: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN s přidavkem a bez přidavku pufru v mobilní fázi obsahující CH ₃ COONH ₄ (c = 15 mmol/l, pH=5).....	62
Obrázek 23: Separace standardů umělých sladidel za optimalizovaných podmínek	63

Seznam zkratk a značek:

ACN	Acetonitril
ACE	Acesulfam K
ADI	Doporučená (přijatelná) denní dávka
ALI	Alitam
ASP	Aspartam
CE	Kapilární elektroforéza
CYC	Cyklamát
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EU	Evropská unie
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIA	Injekční průtoková analýza
GC	Plynová chromatografie
GI	Glykemický index
GL	Glykemická nálož
Glykémie	Koncentrace glukózy v krvi
GRAS	Obecně uznáváno jako bezpečné (Generally Recognized As Safe)
HFCS	Vysoce fruktózový kukuřičný sirup
HPLC	Vysokoúčinná kapalinové chromatografie
IC	Iontová chromatografie
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MRM	Monitorování více reakcí
NEO	Neotam
SAC	Sacharin
SIM	Monitorování vybraných iontů
SUC	Sukralóza
SPE	Extrakce na pevné fázi
STV	Steviosid (Steviol-glykosidy, Stévie)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

Úvod

Dnešní doba je symbolem boje s obezitou, cukrovkou, ale na druhé straně také symbolem hubnutí a zdravého životního stylu. V obou případech jsou z jídelníčku vyřazovány často až demonizované sacharidy. Problémem je hlavně nadměrný příjem cukru, který pokouší naše chuťové pohárky na každém rohu v podobě sladkého pečiva, cukrovinek, sladkostí, ale třeba i alkoholu a může způsobit různé zdravotní potíže. V potravinářském průmyslu se tedy hledá náhrada těchto kalorických bomb.

Vhodnou alternativou se zdají být umělá sladidla, které jsou mnohonásobně sladší než cukr, proto se používají pouze v malých dávkách. Strukturně se podobají molekulám sacharidů, a tak v našich chuťových pohárcích dokážou vyvolat vjem sladké chuti. Naše tělo je nedokáže metabolizovat, proto mají téměř nulovou energetickou hodnotu a neovlivňují hladinu glykémie. Prodávají se v různých nápojích, potravinách a doplňcích pod názvy „light“, „diet“ a „sugar free“. Tyto výrobky jsou vhodné pro konzumenty ke snížení energetického příjmu za účelem hubnutí, regulací příjmu sacharidů a hlídání hladiny glykémie pro cukrovkáře nebo snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění.

V současné době neexistuje studie, která by potvrdila negativní vliv umělých sladidel na lidské zdraví. Jejich využití v potravinářském průmyslu se tak stále zvyšuje, a proto je důležitý vývoj nových analytických metod pro kontrolu jejich obsahu a zajištění bezpečnosti spotřebitele.

1 Sacharidy

Sacharidy jsou pojmenovány z latinského slova *saccharum*, což znamená cukr. Jsou nejrozšířenější skupinou organických látek a jednou ze základních složek všech živých organismů. Nachází se v každé buňce. Fototrofní organismy dokážou z oxidu uhličitého, vody a slunečního záření v procesu fotosyntézy vytvořit sacharidy a převádět tak sluneční energii na energie chemických vazeb v sacharidech. Podle odhadů vytvoří rostliny každý rok více než 200 miliard tun sacharidů. Mají také velký význam jako aditiva v potravinách, kde máme vysokou rozmanitost jejich aplikací a produktů [1-3].

Sacharidy v lidském těle mají hodně důležitých funkcí. Jsou součástí glykoproteinů v chrupavčitých tkáních a kloubech. Glykolipidy jsou důležitou součástí všech buněčných membrán v organismu. Dále jsou součástí řady složitějších látek, nukleových kyselin, koenzymů apod. Sacharidy jsou pro nás důležité zejména proto, že jsou základním pohotovým zdrojem energie. Dominantní postavení má D-glukóza, která je živinou pro každou buňku v těle. Slouží jako rychlý zdroj energie vhodný například pro sportovce přímo při zátěži. Sacharidy se štěpí na glukózu nebo se na ní přeměňují různými metabolickými procesy. V případě nedostatku sacharidů by přestaly fungovat životně důležité orgány a tkáně. Proto si tělo dokáže při nedostatku příjmu sacharidů vytvořit nové sacharidy a glukózu z tuků a bílkovin, což je ale neefektivní a dlouhodobě neudržitelné. Určitá energetická zásoba sacharidů v organismu je ve formě jaterního a svalového glykogenu. Také se udržuje určitá hladina glukózy v krvi tzv. glykémie. Sacharidy regulují celý metabolismus v játrech a na stavu hladiny krevní glukózy a zásobě glykogenu závisí, jestli se přijaté živiny v potravě budou ukládat do tuků nebo se naopak začnou využívat jako zdroj energie i necukerné zdroje [1-6].

Denní příjem sacharidů je pro každého jedince odlišný. Můžeme se pohybovat v rozmezí 170 g až 500 g. Záleží na pohlaví, stáří, fyzické aktivitě a stravovacích zvyklostech. Doporučený příjem sacharidů je 30-50 % našeho denního energetického příjmu, což je pro průměrnou osobu s příjmem okolo 2000 kcal zhruba 150-250 g sacharidů na den. Počátkem roku 2014 vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučení ohledně spotřeby přidaného cukru. Ideálně by přidaný cukr měl být maximálně 5% složkou z celkového denního energetického příjmu. Pro průměrnou osobu to znamená 100 kcal. Třetinka limonády Cola má 140 kcal, což znamená, že po vypití této dávky přesáhnete doporučení WHO. Užitečným měřítkem bude možná čajová lžička, kterých WHO denně doporučuje maximálně šest [5, 7-9]. Energetickou hodnotu energetických substrátů ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1: Energetické hodnoty živin [1, 2, 7, 8]

Živina	Energetická hodnota v 1 gramu
Sacharidy	4,1 kcal (17,2 kJ)
Bílkoviny	4,1 kcal (17,2 kJ)
Tuky	9,3 kcal (38,9 kJ)
Alkohol	7,1 kcal (29,7 kJ)

1.1 Rozdělení sacharidů

Chemicky se jedná o látky s uhlíkovou kostrou doplněné o hydroxylové a karbonylové skupiny. Můžeme je nazývat (poly)hydroxyaldehydy nebo (poly)hydroxyketony. Dají se klasifikovat několika různými způsoby. Z pravidla se dělí podle počtu sacharidových jednotek na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Z výživového hlediska se setkáváme s pojmy jednoduché cukry a komplexní sacharidy. Skupina jednoduchých cukrů obsahuje monosacharidy a oligosacharidy, které se vyznačují sladkou chutí a jsou pohotovým zdrojem energie. Komplexní sacharidy nejsou sladké a mají zásobní a stavební funkci [1, 2, 5, 6, 10]. Přehledný výčet sacharidů, funkcí a jejich výskyt shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2: Základní funkce a zdroje sacharidů [2]

Sacharidy	Základní funkce/zdroj ve výživě
Monosacharidy (cukry)	Pohotový zdroj energie
Glukóza	Ovoce, med
Fruktóza	Ovoce, med
Galaktóza	Mléko
Disacharidy (cukry)	Pohotový zdroj energie
Sacharóza	Cukrová řepa, třtina, ovoce, stolní cukr
Laktóza	Mléko a mléčné výrobky
Maltóza	Obilí, pivo, meziproduct trávení škrobu
Polysacharidy (komplexní sacharidy)	Zásobní a stavební funkce v organismech
Zásobní polysacharidy	Pomalejší a zásobní zdroj energie
Rostlinný škrob	Obiloviny, brambory, rýže
Glykogen (živočišný škrob)	Maso, játra
Inulin	Čekanka, cibule, česnek
Stavební polysacharidy	Nerozpustná vláknina v lidské výživě
Celulóza	Zelené části rostlin
Chitin	Houby, exoskelet hmyzu

Monosacharidy jsou základním stavebním kamenem všech sacharidů. Jsou tvořené jednou cukernou jednotkou, která má cyklický řetězec s 3-7 uhlíky. V přírodě se vyskytují v D-konfiguraci. Nejznámějšími zástupci jsou glukóza (hroznový cukr) a fruktóza (ovocný

cukr). Vyskytují se v ovoci, medu, rostlinách atd. Dalším zástupcem je např. ribóza, která je součástí nukleových kyselin DNA a RNA [1, 2, 4, 6, 10].

Oligosacharidy jsou tvořeny z 2-10 cukerných jednotek spojených O-glykosidovou vazbou. Disacharidy se skládají ze dvou monosacharidů. Nejznámějšími jsou stolní cukr sacharóza (glukóza a fruktóza), mléčný cukr laktóza (galaktóza a glukóza) a sladový cukr maltóza (2x glukóza). Další oligosacharidy mají malý význam [1, 2, 4, 6, 10]. V tabulce 3 je uveden seznam běžných zdrojů sacharidů.

Tabulka 3: Nutriční hodnoty sacharidů a vlákniny ve 100 g vybraných potravin [2, 5]

Potravina [100 g]	Sacharidy [g]	Vláknina [g]
Bílá rýže	80	1
Brambory	21	1,5
Batáty	20	3
Těstoviny bílé	70	4
Ovesné vločky	65	10
Müsli sypané s ovocem	60	10
Celozrnný chléb	48	9
Ovoce (průměr)	15	3
Banán	20	1
Zelenina (průměr)	10	5
Luštěniny (průměr)	60	16
Sója	30	12
Milka mléčná	59	1,8
Pytlík Bon Pari	95,5	0,6
Bonbóny Žížalky	77,5	0

Polysacharidy jsou tvořené více než deseti monosacharidy. Často vytvářejí dlouhé řetězce ze stovek až tisíců cukerných jednotek a vytvářejí přírodní polymery. Z hlediska výživy je označujeme jako komplexní sacharidy. Mají pro nás dvě zásadní funkce – zásobní a stavební. Zásobními polysacharidy je rostlinný škrob a živočišný glykogen. Škrob je tvořen z amylozy (lineární polymer několika set glukózových jednotek) a amylopektinu (rozvětvené molekuly tisíců glukózových jednotek). Rostlinné škroby jsou hlavní složkou lidské výživy. Vyskytují se například v bramborách, rýži a obilovinách. Zásobním polysacharidem u zvířat, člověka a hub je glykogen. Strukturou se podobá amylopektinu, ale je více rozvětvená. Člověk má asi 400 g glykogenu, který je uložen v játrech a svalech. Polysacharidem fruktózy je inulin (20-30 jednotek fruktózy zakončených glukózou). Je zdrojem energie pro střední mikroflóru a jedním z přírodních probiotik. Kvůli sladké chuti a skoro nulové kalorické hodnotě se používá i jako sladidlo, které je sladší než sacharóza. Nachází se v čekance, pampeliškách, artyčoku,

cibuli a česneku. Stavebním polysacharidem je celulóza. Je základní složkou buněčných stěn a pletiv všech rostlin. Má převážně stavební funkci a tvoří největší část hmoty rostlin. Lidi ani většina živočichů ji nedokáže rozložit a vstřebat jako živinu. Je součástí dřeva, papíru, bavlny a dalších běžně užívaných přírodních látek. Dalším stavebním polysacharidem je chitin, který je hlavní stavební složkou exoskeletu členovců a buněčných stěn hub [1, 2, 5, 6, 10].

1.2 Metabolismus sacharidů

Sacharidy přijaté v potravě jsou štěpeny slinnou α -amylázou v dutině ústní, kde dochází k hydrolyze škrobu a glykogenu, které se štěpí na směs kratších řetězců. Ve slinách je i enzym lysozym, který dokáže narušit peptidoglykanové stěny grampozitivních bakterií a má ochrannou a imunitní funkci. Dále trávení pokračuje v tenkém střevě pomocí pankreatické α -amylázy, která taktéž štěpí polysacharidy na kratší řetězce. Disacharidy procházejí v nezměněné podobě až do dvanáctníku stejně jako nestavitelná celulóza. V oblasti tračnicku a kyčelníku tenkého střeva se dokončuje trávení sacharidů na kartáčovém lemu buněk mikrokloků střevní sliznice pomocí hydrolytických enzymů glykosidáz. Všechny stravitelné polysacharidy a oligosacharidy se zde štěpí na jednotlivé monosacharidy [2, 6].

Ty jsou dále vstřebávány skrz střevní sliznici difúzí pomocí přenašeče (pasivně) nebo sodíko-draslíkové pumpy (aktivně). Vrátnicovou žilou se pak dostávají do jater a následně do krve. Zde jsou zdrojem krevní glukózy a udržují její určitou hladinu v krvi neboli glykémii. Ostatní monosacharidy se v játrech přeměňují na glukózu nebo meziproducty, které se zapojují do glykolýzy v buňkách. Normální hladina glykémie zdravého člověka je 3,9-5,5 mmol/l v žilní krvi a do 10 mmol/l po jídle [2].

Hladinu glykémie zvyšuje trávení sacharidů z potravy. Ke zvyšování hladiny glukózy v krvi dochází i štěpením jaterního a svalového glykogenu (glykogenolýza) nebo přeměnou glukogenních aminokyselin a glycerolu ze svalů a tukové tkáně na glukózu (glukoneogeneze) [2, 4, 11]. U glykogenolýzy navíc rozlišujeme štěpení jaterního a svalového glykogenu. Zatímco primární funkcí jaterního glykogenu je udržení glykémie při hladovění nebo fyzické aktivitě. Uvolněná glukóza cestuje z jater do krve, odtud ji mohou využít jako zdroj energie jiné důležitější tkáně a orgány. Při hladovění může hladina jaterního glykogenu klesnout prakticky na nulu, ale při příjmu potravy se rychle obnoví. Průměrná zásoba jaterního glykogenu v těle je 80-100 g. Oproti tomu svalový glykogen slouží k bezprostřednímu a rychlému uvolnění energie pouze pro práci daného svalu. Glukóza z něj se nikdy nemůže uvolňovat zpět do krve, proto nemůže sloužit jako zdroj energie pro jiné orgány. Jeho zásoba

se pohybuje okolo 300-350 g. U průměrného dospělého člověka je zásoba glukózy jako ústřední živiny celého metabolismu v krvi a dalších extracelulárních tekutinách pouze 15 g, což odpovídá 60 kcal. Naproti tomu 400 g glykogenu v játrech a svazech představuje rychle mobilizovatelný zdroj energie, který vydrží cca na 20 hodin hladovění nebo 60-90 minut intenzivního tréninku. Průměrné zásoby energie v organismu shrnuje tabulka 4 [2, 11].

Tabulka 4: Průměrné zásoby energie v organismu [2]

Energetické zásoby	Hmotnost [g]	Energie [kcal]
Glykémie (glukóza v krvi)	15	40
Svalový glykogen	300-350	1340
Jaterní glykogen	80-100	305
Bílkoviny	12000	47800
Tuková tkáň	10500	92850

Ke snížení hladiny glykémie naopak dochází při syntéze glykogenu, glykoproteinů, glykolipidů atd. Dále také při spalování glukózy v procesu glykolýzy, kdy dojde k vychytání glukózy buňkami, její oxidaci a zisku energie. Samotný mozek spotřebuje denně asi 120 g glukózy. Glukóza vstupuje do buněk volně (mozek, červené krvinky, jaterní buňky) nebo v závislosti na inzulinu (kosterní a srdeční sval, tuková tkáň). Rychlost transportu glukózy do buněk závislých na inzulinu je závislá na množství použitého inzulinu. Glykolýza se skládá z několika po sobě jdoucích reakcí, jejichž produktem je pyruvát. V anaerobních podmínkách se z něho vytvoří laktát a v aerobních podmínkách vznikne acetylkoenzym A. Na glykolýzu navazují Krebsův cyklus a terminální dýchací řetězec, ve kterých dojde k přeměně produktů glykolýzy na energii ve formě ATP. Výťažnost aerobní a anaerobní glykolýzy se značně liší. Aerobní glykolýzou buňka získá 36-38 molů ATP úplným spálením glukózy, kdežto anaerobní glykolýzou velmi pohotově pouze 2 moly ATP [2, 5, 11].

1.2.1 Cukrovka a inzulinová rezistence

Osoby trpící cukrovkou 1. typu (diabetes mellitus 1. typu) nejsou schopni vylučovat ze slinivky inzulin vůbec [2, 12, 13]. Jedná se zhruba o 5 % z celkového počtu diabetu a v současné době je to neléčitelné autoimunitní onemocnění. Terapie je založená na zevním podávání inzulinu. Jednou z příčin vzniku diabetu 1. typu může být brzké zavádění kravského mléka do stravy kojence [12, 13].

Pokud jde o cukrovku 2. typu (diabetes mellitus 2. typu), tak slinivka nevylučuje inzulin v dostatečné míře a tkáně jsou na inzulin méně citlivé (inzulinová rezistence) [2, 13]. Inzulinová rezistence je hormonální porucha účinku inzulinu, při kterém se normální plazmatické hodnoty inzulinu v organismu vyvolávají slabší biologickou reakci. Jde o stav, kdy slinivka břišní na základě přijaté stravy uvolní dostatečné množství inzulinu, ale i při jeho dostatku nebo nadbytku není schopen efektivně převádět glukózu v krvi do buněk. Glukóza se pak hromadí v krvi. Tento jev lze zjednodušeně popsat jako otupělost k působení inzulinu po jeho dlouhodobém nadbytku v krvi [4, 6, 13]. Navíc je porušena i signalizace hormonu leptinu. Ten produkují tukové buňky a jeho funkcí je regulace chuti k jídlu a tělesné hmotnosti. Leptin signalizuje mozku, kdy je potřeba jíst a kdy už jsme sytí a nemáme se přejídat [12].

Oba typy cukrovky vedou k nežádoucím hyperglykemiím. Organismus není schopen zvýšenou hladinu glukózy uklidit do svalových či tukových buněk a dochází k opakovaným nebo dlouhodobým zvýšeným hodnotám glykémie. Naopak hypoglykémie může diabetik dosáhnout při předávkování inzulinem. Hlavním problémem cukrovky je tedy chronická hyperglykemie, která většinou dosahuje 2x až 3x větších hodnot glykémie, než je tomu u zdravého člověka [2, 13].

Tyto zvýšené hodnoty působí negativně na vnitřní výstelku všech cév a způsobují kardiovaskulární problémy. Mohou se projevit jako diabetická retinopatie (poškození cév prokrvující sítnici oka), diabetická nefropatie (poškození ledvin), diabetická angiopatie (poškození velkých cév – např. koronární tepny, což může vést k infarktu myokardu nebo tepen v mozku, což může vést k mozkové mrtvici), atd. Podle některých odborníků je dokonce i vyšší riziko vzniku Alzheimerovy choroby [4].

Cílem léčby diabetu je snaha o co největší udržování hodnoty glukózy v krvi v normálním rozmezí a rychlé potlačení hyperglykémie [2, 13]. Toho docílíme omezením jednoduchých cukrů a vysoce zpracovaných potravin. Krom stravy je nutné dbát i na pravidelný pohyb [12, 13].

1.2.2 Glykemický index sacharidů a další ukazatele

Kvalita zdrojů sacharidů ve výživě je závislá na několika základních faktorech. Nejdůležitějším je absolutní obsah (množství) sacharidů v dané potravine. Vyjadřuje se jako počet gramů sacharidů na 100 g potraviny. Dalším faktorem je spektrum obsažených sacharidů. Jedná se o poměr jednoduchých cukrů a komplexních sacharidů z celkového počtu sacharidů. Obsah cukrů se musí povinně uvádět na obalech potravin. Posledním faktorem je obsah dalších látek v potravine, které ovlivňují trávení a vstřebávání obsažených sacharidů. Jde především o tuky, bílkoviny a vlákninu, které zpomalují trávení sacharidů. Neméně důležitý je i obsah minerálních látek, vitamínů a dalších mikronutrientů, které zvyšují nutriční hodnotu potraviny. Pro zdravou výživu je důležitý obsah sacharidů, jejich trávení a absorpce do krve. Pro lepší orientaci je zavedeno několik ukazatelů, jako je například glykemický index [2].

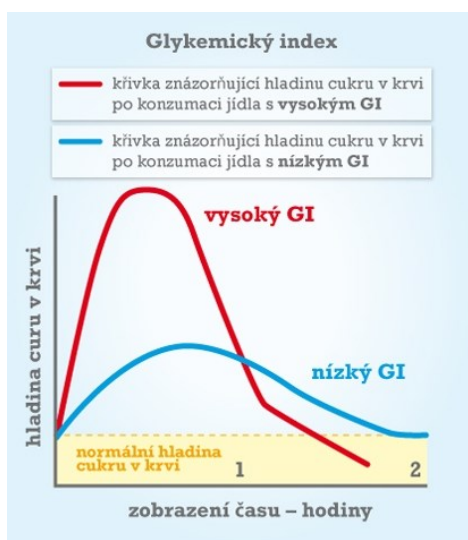
Glykemický index

Glykemický index byl poprvé představen v roce 1981. Vyjadřuje rychlost trávení sacharidů v potravine a jejich vstřebávání do krve. Respektive jde o rychlost nárůstu krevní glukózy (glykémie) po konzumaci dané potraviny. Jde o bezrozměrnou veličinu, která srovnává nárůst krevní glukózy po požití potraviny s nárůstem požití stejného množství sacharidů ve formě čisté glukózy. Dříve byl jako referenční potravina používán bílý chléb. Dnes je používána jako standard glukóza a má hodnotu glykemického indexu (GI) = 100. Pokud budeme mít potravinu s GI = 50, znamená to, že se bude trávit, vstřebávat a uvolňovat ve formě glukózy 2x pomaleji. Čím vyšší je hodnota GI, tím rychleji stoupne hladina glykémie po požití dané potraviny a zároveň tak lze využít glukózu jako zdroj energie z potraviny rychleji. Průběh glykémie po požití dané potraviny v čase vyjadřuje glykemická křivka (obrázek 1). Glykémie dosahuje vrcholu zhruba po 30 minutách po příjmu potraviny a následně se snižuje na počáteční hodnotu, jako před snědením potraviny. Celý tento proces trvá zhruba 2 hodiny. Zvýšenou hladinu glukózy v krvi snižujeme inzulinem, který ji uloží např. do svalů nebo tuků [2, 4-6, 14-17].

Problémem je, že u potravin s vysokým GI je vyloučeno více inzulinu, než je potřeba k převedení daného množství glukózy v krvi. Důsledkem toho může dojít k nadměrnému poklesu glykémie, než jaká byla před konzumací potraviny. Dojde k hypoglykémii, která je doprovázena nepříjemnými pocity hladu a chuti na sladké [2, 6].

Potraviny dělíme do 3 skupin podle GI [2, 5, 14-16]:

- S vysokým GI (>70) – zvedají glykémii velmi rychle. Tím dochází k vyloučení většího množství inzulínu, což vede k urychlenému nástupu pocitu hladu. Do této skupiny patří chléb, sladké pečivo, hranolky, pizza, chipsy, med, sladkosti, čokoláda, ale třeba i pivo.
- Se středním GI (56-69) – zvedají glykémii středně rychle. Patří sem celozrnné pečivo, ovesné vločky, rýže, brambory, knedlík, těstoviny, banán, bílý rohlík, a dokonce i zmrzlina.
- S nízkým GI (<55) – zvedají glykémii pomalu a navozují pocit sytosti po delší dobu. Jsou doporučovány v dietách a pro diabetiky. Patří sem ovoce, zelenina, luštěniny, tmavá rýže, ořechy, žitné pečivo, atd.



Obrázek 1: Glykemická křivka [18]

Glykemická nálož

Na rozdíl od glykemického indexu zahrnuje glykemická nálož i množství sněžených sacharidů v dané potravíně a celkové množství potravin, kterou v daném jídle sníme. Glykemická nálož (GL) zohledňuje i množství sněžených sacharidů, které mají vliv na celkovou velikost glykémie po jídle. Z toho vyplývá, že malé množství potravin s vysokým GI zvyšuje glykémii jen nepatrně. Naopak velké množství potravin s nízkým GI může ovlivnit hodnotu glukózy v krvi dramaticky [2, 15, 16]. Výpočet glykemické nálože se provádí následovně:

$$GL = GI * \text{množství sacharidů v gramech} / 100$$

Pokud vezmeme jako příklad croissant (GI = 75, váží 45 g, obsahuje 20 g sacharidů). Výsledná GL = $75 * 20 / 100 = 15$. Oproti tomu 100 g rýže (GI = 54, obsahuje 78 g sacharidů). Výsledná GL = $54 * 78 / 100 = 42$. Z toho plyne, že jeden croissant s vysokým GI zvedne glykémii výrazně méně než 100 g porce rýže s nízkým GI. Stejně jako u GI se potraviny dělí do tří skupin dle GL [2, 15]:

- S vysokou GL (>20) – těstoviny, rýže, sušenky, čokoláda, atd.
- Se střední GL (11-19) – brambory, ovesné vločky, apod.
- S nízkou GL (<10) – ovoce, zelenina, mléčné výrobky, atd.

Tyto ukazatele vznikly především pro diabetiky. Jsou pomůckou pro výběr těch nevhodnějších potravin dle jejich vlivu na hladinu krevního cukru. Stejně tak jsou orientační pomůckou pro osoby trpící obezitou. Pro aktivního zdravého člověka mají tyto ukazatele omezený vliv, protože aktivní člověk má vyšší energetický výdej i bazální metabolismus a potřebuje vyšší objem snadno a rychle vstřebatelných sacharidů k regeneraci organismu nebo dokonce nárůstu svalové hmoty. Z tohoto důvodu pro ně mají tyto ukazatele spíše informační charakter ovlivňování naší sytosti [2, 6, 14].

Ve skutečnosti je GI a tedy i GL pouze orientační hodnota, protože je závislá na celé řadě faktorů. Prvním problémem je odlišná metodika stanovení GI v různých studiích. Jednalo se například o extrakci sacharidů z potraviny, což ovlivňuje glykémii jinak, než kdyby potravina obsahovala i další přirozené složky potravy. U jiných studií se běžně uvádí průměr výsledků z několika dalších studií. Můžeme se pak setkat s hodnotou GI u vařených brambor od 56 až přes 100 [2].

Dalším faktorem je tepelná úprava potravin. Čím déle a méně šetrně potravinu vaříme, pečeme, smažíme, pečeme, apod., tím rychleji se sacharidy z potraviny zpracovávají a tím vyšší je GI. Pečené brambory v troubě mají GI = 85-95, vařené brambory bez slupky GI = 80, kdežto brambory vařené v páře nebo ve vodě se slupkou jen 65. Podobný účinek má i mechanické zpracování potravin jako je mixování, mletí, atd. Potravina se stává přístupnější pro trávicí enzymy a glukóza se vstřebává rychleji. Proto bude mít bramborová kaše větší GI než samotné brambory [2, 14-17].

Glykemický index je také ovlivněn kombinací potravin a živin. Málokdy konzumujeme potraviny pouze samotné. Většinou konzumujeme smíšená jídla. Tím se rozumí kombinace více potravin, které obsahují i jiné živiny než sacharidy. Bílkoviny, tuky, vláknina nebo kyseliny v jídle zpomalují trávení sacharidů a snižují tak GI. Z potraviny s vysokým GI se může stát komplexní jídlo, které má nízké GI. Příklad kombinace potravin shrnuje tabulka 5. Výsledné jídlo má nižší GI a jinou inzulinovou odpověď [14-17, 19].

Tabulka 5: Glykemický index různých kombinací potravin [19]

Kombinace potravin (standard glukóza = 100)	GI
Samotná rýže	96
Rýže s listovou zeleninou	82
Rýže s kuřecím prsem	73
Rýže vařená s olejem	67
Rýže s kuřecím prsem, olejem a zeleninou	50

Inzulinový index

Inzulinový index je veličina, která nám přesně udává skutečnou inzulinovou odpověď pro danou potravinu. Experimentálně měří zvýšení koncentrace inzulinu v krvi v intervalu 2 hodin po příjmu potravin (obsahující stejné množství energie – zpravidla 1000 kJ = 239 kcal). Zavedl se kvůli nepřiměřeně zvýšené koncentraci inzulinu u některých druhů potravin i přesto, že obsahují velmi malé množství sacharidů a téměř nulový GI. U drtivé většiny potravin je GI (nárůst glykémie) přímo úměrný inzulinovému indexu (vyloučenému množství inzulinu). U některých typů potravin to však neplatí. Jedná se především o libové maso (kuřecí, hovězí, ryby), některé mléčné výrobky (bílý jogurt, tvaroh), pekařské výrobky a sladkosti (sladké pečivo, sušenky, dorty). Inzulinový index závisí i na množství a kvalitě obsažených bílkovin, tuků a vzájemných interakcí těchto živin v potravine. Vyloučení inzulinu tedy nezávisí pouze na obsahu glukózy a sacharidů [2].

Inzulin je zodpovědný za ukládání glukózy do buněk, ale i za ukládání aminokyselin (z bílkovin) a mastných kyselin (z tuků). Potraviny s vysokým obsahem bílkovin mohou zvýšit vylučování inzulinu [2]. Tuk sám o sobě vyloučení inzulinu nezpůsobuje, ale v kombinaci se sacharidy výrazně zesiluje jeho vylučování. Také se ukázalo, že společný příjem sacharidů a tuků zvyšuje glykémii více, než by odpovídalo stejnému množství sacharidů. Tuky zpomalí vstřebávání sacharidů, ale to jen oddálí vrchol křivky GI. Z tohoto důvodu jsou nejhorší volbou jídla z fastfoodu, které obsahují vysoké množství sacharidů, smažených tuků a nekvalitních bílkovin [20, 21]. U aktivních lidí není problém se zvýšenou hodnotou inzulinu, protože inzulin nasává živiny potřebné k regeneraci glykogenu a reparaci svalových bílkovin. U nespportující populace se sedavým způsobem života je situace samozřejmě jiná. Jejich svaly nepotřebují doplnit svalový glykogen, ani živinami pokrýt regeneraci, proto nadbytečnou energii uloží inzulin primárně do tukové tkáně [2, 21].

Stejně jako u GI a GL je inzulinový index limitován faktory nejednotné metodiky stanovení, tepelnou úpravou, kombinací živin, apod. V rámci inzulinového indexu je důležitá individuální variabilita hodnot inzulinové odpovědi potravin. Bylo zjištěno, že stejná potravina

vyvolá u dvou lidí se stejným věkem, hmotností, pohlavím, výkonností, atd. různé vyloučení inzulínu. Inzulínový index je tedy do jisté míry pro každou potravinu individuální. To nám ukazuje, že na stejné množství živin a potravin reagují různí jedinci různě. Proto neexistuje žádná univerzální dieta pro každého a je nutné dbát i na individuální přístup [2, 20].

Potřeba inzulínu po jídle (FID)

Podobně jako u GL byl i pro inzulínový index vytvořen ukazatel, který zohledňuje vliv množství přijaté potravy na celkové množství vyloučeného inzulínu. Označuje se jako Food Insulin Demand (FID) a vypočítá se následovně:

$$\text{FID} = \text{energie v daném množství potravy [kJ]} * \text{inzulínový index} / 1000$$

Tento ukazatel je dále zkoumán jako moderní a přesnější nástroj pro výpočet správného dávkování jednotek inzulínu pro diabetiky. Inzulínový index je stále považován za zlatý střed při léčbě cukrovky [2, 21].

1.2.3 Fruktóza a její škodlivost

Fruktóza také označovaná jako levulóza nebo ovocný cukr. Je izomerem glukózy. Pro někoho je hůře stravitelná a může způsobovat průjemy a nadýmání. V minulosti se doporučovala diabetikům, protože má nižší GI než glukóza. Proto byla považována za zdravější. Léta se prodávala v potravinách označených dia jako hlavní sladidlo. Nachází se v ovoci, ale i v kukuřici, která je v Americe už léta dotovaná. Díky tomu jí je všude dostatek a drží si nízkou cenu. Vyrábí se z ní vysoce fruktóзовý kukuřičný sirup (HFCS).

Tento sirup obsahuje vyšší množství fruktózy. Problémem je právě koncentrované a nadměrné množství fruktózy využívané jako sladidlo zejména v limonádách. Při nadbytku se v játrech snadno přeměňuje na tuky. Navíc zvyšuje hladinu hormonu ghreninu, který zvyšuje chuť k jídlu. Dále podporuje riziko vzniku inzulínové rezistence a diabetu 2. typu. Paradoxem tak je, že škodí tam, kde měla chránit. Česká diabetologická společnost už zakázala označení dia na potravinách. Navíc podporuje tvorbu kyseliny močové, která vytváří prozánětlivé prostředí a zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění. Dále snižuje hladinu prospěšného HDL cholesterolu a zvyšuje hladinu škodlivého LDL cholesterolu. Nicméně pokud budeme konzumovat fruktózu pouze z ovoce, tak nám žádné problémy nehrozí [4, 5, 9].

2 Umělá sladidla

Mnoho faktorů má vliv na to, které jídlo budeme preferovat. Zřejmě tím největším je chuť. Geneticky jsme naprogramováni k preferenci sladkých chutí. Tento mechanismus se vyvinul evolučně. V minulosti byla slaná a sladká chuť považována za energeticky výživnou potravinu. Naopak kyselá a hořká chuť měla značit jedovaté nebo zkažené jídlo. Z tohoto důvodu jsou sladidla v potravinářství tak oblíbená [2, 22]. Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008, o potravinářských přídatných látkách, se monosacharidy, disacharidy a oligosacharidy nepovažují za aditivní látky. Sladidla lze však klasifikovat jako potravinářskou přídatnou látku, patřící do třídy náhradních sladidel [23].

Umělá sladidla jsou látky s mnohem vyšší sladivostí než obyčejný řepný cukr neboli sacharóza. To znamená, že můžeme použít mnohem menší dávky, než by tomu bylo u cukrů. Vyšší sladivost je způsobena vyšší vazebnou afinitou k sladkým receptorům. Sacharóza se štěpí na glukózu a fruktózu a je standardem v porovnávání sladivosti s ostatními cukry a sladidly. Umělá sladidla mají nulový nebo téměř žádný obsah kalorií díky tomu, že je nedokážeme metabolizovat. Strukturou se podobají molekulám sacharidů, proto mohou v našich chuťových pohárcích vyvolat vjem sladké chuti. Chuťové pohárky vyšlou signál do mozku a my registrujeme sladkou chuť. Díky strukturální podobnosti s cukry se aktivují stejné receptory na jazyku. S tím rozdílem, že je náš trávicí trakt obvykle nedokáže vstřebat, proto pro nás mají téměř nulovou energetickou hodnotu. Mají velký význam při nahrazování cukrů a snižování energetické hodnoty, což je žádoucím jevem pro mnoho konzumentů. Z těchto důvodů se umělá sladidla často přidávají do potravin, nápojů, potravinových doplňků a suplementů. Tyto výrobky se označují jako „light“, „diet“ i „sugar free“ a mohou být účinnou zbraní v boji proti obezitě, hubnutí, kardiovaskulárním onemocněním a léčbě cukrovky [2, 22, 24-32].

Mohou být vyrobeny chemickou syntézou nebo získány z rostlinných extraktů. Prvním komerčně dostupným umělým sladidlem uvedeným na trh byl sacharin v roce 1879. Od té doby značně vzrostla jejich spotřeba. Existuje více než 115 rostlinných sloučenin s udanou sladkostí, ale pouze omezený počet běžně používaných přírodních a rostlinných sladidel. Schvalují se dle jejich vlastností, relativní sladkosti a doporučené denní dávky (ADI). Kromě své extrémní sladkosti jsou známy i hořkou a kovovou dochutí, které neposkytují lahodný pocit v ústech jako cukr. Kombinací sladidel dojde k celkovému zlepšení chuti. Přičemž každé sladidlo maskuje chuť toho druhého a vykazuje synergické účinky, díky kterým je výsledná směs sladší než její složky. Velmi známým příkladem takové směsi je směs sacharin-cyklamát v poměru 1:10. Hořká dochuť sacharinu je maskována cyklamátem a nepříjemná dochuť

cyklamátu, kterou někteří lidé cítí, je maskována sacharinem. Současně se díky synergickému účinku zvyšuje sladivost směsi. V současné době bylo americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleno několik nízkokalorických umělých sladidel: sacharin, acesulfam, aspartam, neotam, sukralóza a advantam. V evropské unii je schváleno širší portfolio umělých sladidel. Evropský úřad pro bezpečnost potravin schválil alitam, neohesperdin a cyklamát, který je v USA zakázán. Mezi schválené a nejčastěji používaná přírodní sladidla patří steviol glykosidy, thaumatin a ovocný extrakt Luo Han Guo. Rozdíly mezi nápoji slazenými cukry a nápoji slazenými umělými sladidly jsou uvedeny v tabulce 6 [24, 25, 28, 30, 32-35].

Tabulka 6: Porovnání slazených nápojů a jejich variant bez cukru [36, 37]

Výrobce	Varianta	Sacharidy [g]	Z toho cukry [g]	Energetická hodnota [kcal/100 ml]	Použitá sladidla
Coca-Cola	Original	11,2	11,2	45,4	
Coca-Cola*	Zero	0	0	0,2	acesulfam K, aspartam, cyklamát
Pepsi Cola	Original	11	11	43,5	
Pepsi Cola*	Max	0,1	0,1	0,4	acesulfam K, aspartam
Kofola	Original	8	8	32,5	
Kofola*	bez cukru	0,1	0,1	1,7	acesulfam K
Monster	The Doctor VR/46	17	16	71,2	
Monster*	Energy ultra	0,9	0	2,4	acesulfam K, sukralóza
Red Bull	Energy drink	11	11	46,4	
Red Bull*	Sugar free	0	0	3,1	aspartam, acesulfam K
Big Shock	Galaxy drink	12,5	12,5	52,8	
Big Shock*	Zero sugar	0,02	0,02	2	acesulfam K, aspartam
Semtex	Original	12	12	50,4	
Semtex*	NØ sugar	< 0,5	< 0,5	4	acesulfam K, sukralóza

* Vyznačené nápoje jsou se sníženým obsahem cukru

2.1 Zdravotní rizika

Bezpečnost umělých sladidel je jedno z nejvíce kontroverzních témat. Patří také mezi nejčastěji testovaná aditiva v potravinách. V Evropské unii (EU) musí před použitím projít důkladným posouzením zdravotní nezávadnosti. Testy provádí Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). Hodnotí se toxikologické studie prováděné na zvířatech, které se pak převádějí na lidskou populaci. Následně se stanoví doporučená denní dávka (ADI), která udává množství sladidla, které je bezpečné pro každodenní konzumaci v průběhu celého života. Tato hodnota představuje setinu maximální dávky, která neměla žádné prokázané účinky při pokusech. To znamená, že i kdybychom překročili hodnotu ADI stokrát, tak nedojde k žádnému poškození zdraví. Navíc se umělá sladidla díky vysoké sladivosti vyskytují v potravinách ve velmi malých koncentracích, které se zdaleka nepřibližují množství, jenž se používá ve studiích prováděných na zvířatech při posuzování bezpečnosti. V současné době neexistuje výzkum, který by potvrdil negativní vliv na lidské zdraví při konzumaci tohoto nebo nižšího množství [2, 22, 24, 28, 38, 39].

Nalezneme i studie, které poukazují na negativní vliv umělých sladidel. Často však sledují jeden konkrétní jev, a ne další podmínky. Poukazují například na poškození mikrobiomu a zhoršení inzulínové odpovědi [40, 41]. Většina těchto studií je však prováděna na laboratorních krysách, které mají odlišný metabolismus a jsou jim podávány vyšší dávky [5, 40, 42-46]. Ze studie na lidech bylo zjištěno že umělá sladidla konzumují obvykle osoby s vyšším BMI nebo obézní lidé [40, 47]. Právě obezita je jeden z klíčových faktorů, který vede k inzulínové rezistenci a cukrovce 2. typu. Závěry této studie lze vysvětlit reverzní kauzalitou, kdy obézní lidé s již vzniklou inzulínovou rezistencí konzumují umělá sladidla s cílem zhubnout. V další studii byl konzumován sacharin po dobu jednoho týdne v maximální přijatelné dávce [40]. U někoho došlo ke zhoršení glykemické odpovědi, ale u někoho zase naopak ke zlepšení. Autoři neudávají přesná data glykemických odpovědí, nesledují jídelníček a pozorování jedinci před touto studií umělá sladidla nekonzumovali. Došlo tak uměle k navýšení příjmu umělých sladidel na cca 6 plechovek dietní koly denně. To neodpovídá reálným podmínkám. Mikrobiom je navíc schopný se za určitý čas adaptovat na různé způsoby stravování. Tato studie je tedy limitována i její délkou jednoho týdne a výsledky se sacharinem nejsou automaticky přenositelné na jiná umělá sladidla [40, 48].

Dalším mýtem je, že po požití umělých sladidel dochází k uvolnění inzulínu, který krevní cukr uloží do tkání a dochází k hypoglykémii, po které následuje pocit hladu a přejídání. Vylučování inzulínu je však řízeno hladinou glukózy. Jelikož umělá sladidla nedokážeme metabolizovat, tak nedochází k nárůstu krevního cukru a ani k vylučování inzulínu. Pokud by se inzulín vyplavoval bez nárůstu hladiny glykémie, tak bychom měli lék na diabetes 1. typu [42].

Konzumace umělých sladidel je často negativně spojována s homeostázou glukózy, nárůstem hmotnosti, obezitou, změnou mikroflóry nebo cukrovkou 2. typu [25, 30, 49-51]. Neexistují studie, které by předložily konkrétní důkazy, které by prokázaly souvislost těchto negativních vlivů s konzumací umělých sladidel. Většina studií má nedostatky, které vedou pouze k náhodným tvrzením bez patřičné spolehlivosti [24, 25, 30, 50, 51]. Hladina krevní glukózy po požití umělých sladidel ukázala nižší, vyšší i žádnou změnu. Na základě dostupné literatury proto nelze stanovit účinek umělých sladidel na homeostázu glukózy [25, 52-55]. Některé studie ukazují na zvýšené riziko cukrovky 2. typu, jiné zase neuvádějí žádnou souvislost. Samotní autoři uznávají, že k výsledkům je potřeba nahlížet opatrně a neměly by být považovány za samozřejmost. To může být způsobeno reverzní kauzalitou a dalšími faktory [25, 56-62]. Z hlediska nárůstu hmotnosti a obezity jsou opět sledovány oba jevy. Tedy nárůst hmotnosti, její úbytek nebo žádné změny [63-67]. Skupiny, které by měly omezit příjem umělých sladidel jsou děti a těhotné a kojící ženy. Ne však kvůli jejich škodlivosti, ale spíše kvůli nedostatku vědeckých studií. Příjem aspartamu by si měly pohlídat osoby s fenylketonurií [2, 35, 38, 68].

Na základě vědeckých výzkumů lze s jistotou říci, že se umělá sladidla nepodílejí na vzniku zubního kazu a u člověka nezpůsobují rakovinu [2, 35, 38, 68]. Podle dosavadních důkazů jsou umělá sladidla považována za bezpečná a není důvod se jich obávat. Mohou nám poskytnout i různé benefity. Nahrazením slazených nápojů za jejich dietní variantu dojde ke snížení počtu kalorií a možnému úbytku váhy, což je pozitivní v dietách nebo u obézních lidí. Diabetikům pomáhají regulovat množství přijatých sacharidů a nezvyšovat hladinu glykémie. Umělá sladidla jsou vhodnou alternativou, pokud si nechceme odepřít sladkou chuť. Nicméně je potřeba sladit s mírou, protože zvýšené stimulování chuťových pohárků může vést ke zvýšené chuti na sladké nebo také tomu, že nám běžné potraviny budou připadat nedostatečně sladké. Místo náhrady cukru za umělá sladidla by bylo vhodné spíše omezovat příjem volných a přidaných cukrů. Z hlediska zdraví bychom měli preferovat průmyslově nezpracované potraviny a pít čistou vodu nebo jiné neslazené nápoje [2, 5, 22, 40, 69].

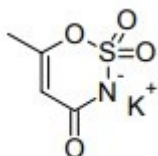
2.2 Dělení umělých sladidel

Sladidla můžeme rozdělit dle několika kritérií. Z chemického hlediska dle jejich struktury na proteiny a peptidy (thaumatin, aspartam), halogenované disacharidy (sukralóza), terpeny (steviosid), atd. Podle původu je dělíme na látky přírodní (thaumatin, steviosid), chemicky modifikované (sukralóza, aspartam) a syntetické (acesulfam K, sacharin, cukerné alkoholy). V potravinářství je dělíme podle jejich výživové hodnoty. První skupinu tvoří výživová (kalorická) sladidla, jako například cukerné alkoholy. Druhou početnější skupinu tvoří nevýživová (nekalorická) sladidla, kam patří téměř všechny přírodní, modifikované přírodní a syntetické látky [49, 70, 71].

2.2.1 Nevýživová umělá sladidla

2.2.1.1 Acesulfam K

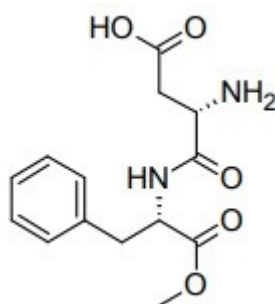
Acesulfam (ACE) byl objeven v Německu roku 1967. Písmeno K v názvu odkazuje na draslík, který obsahuje. Jeho přesný název je 6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid a jedná se o syntetické sladidlo s molekulovou hmotností 201,24. Jeho chemickou strukturu lze vidět na obrázku 2. Vyrábí se syntézou kyseliny sulfamové a diketenu. Nejprve vzniká acetoacetamid-N-sulfonové kyseliny, která tvoří cyklickou strukturu za přítomnosti oxidu sírového. Finálním krokem syntézy je reakce s hydroxidem draselným, kdy vzniká draselná sůl neboli acesulfam K. Je zhruba 200x sladší než sacharóza s vysokou rozpustností ve vodě. Tělo ho není schopno metabolizovat a neobsahuje tedy žádné kalorie. Vzhledem ke své termostabilitě je vhodný k tepelným úpravám. Díky nahořklé pachuti se často kombinuje s ostatními sladidly, aby se chuť podobala více sacharóze [2, 22, 24, 72-74].



Obrázek 2: Chemická struktura acesulfamu K [75]

2.2.1.2 Aspartam

Aspartam (ASP) byl objeven v roce 1965 při hledání léku na žaludeční vředy. Chemická struktura této látky je uvedena na obrázku 3. Je cca 180x sladší než cukr. Je mírně rozpustný ve vodě a jeho rozpustnost se zvyšuje s vyšším nebo nižším pH i se zvýšenou teplotou. Obsahuje 4 kcal/g, ale vzhledem k obrovskému sladicímu účinku jsou používaná množství tak malá, že jeho kalorická hodnota v potravinách je zanedbatelná. Chuťově se velmi podobá sacharóze, proto je v potravinářství velice oblíben. Nedoporučuje se ho používat při vysokých teplotách. Není termostabilní, a proto by docházelo ke ztrátám sladivosti. Je tvořen dvěma aminokyselinami: fenylalaninem a kyselinou asparagovou. Obě tyto látky se běžně nacházejí v přírodě. Kyselina asparagová se může přeměnit na methanol, který je ve vysokých koncentracích toxický. Při konzumaci aspartamu je však tato dávka zanedbatelná. Na příjem tohoto sladidla by si měli dávat pozor lidé s dědičným onemocněním zvaným fenylketonurie. Kvůli této nemoci nejsou schopni metabolizovat aminokyselinu fenylalanin a musejí si její příjem ve stravě hlídat. Byl také zjištěn vysoký výskyt leukémie a lymfomů u laboratorních potkanů, kteří konzumovali obrovské dávky aspartamu. Pokud by se však výsledky měli přenést na člověka (80 kg), tak by každý den musel vypít 2000 plechovek dietní koly. Navíc hlodavci zpracovávají aspartam jiným způsobem a výsledky jsou proto zavádějící. Jeho zdravotní nezávadnost byla testována i u dětí, diabetiků, obézních lidí a kojících žen. S jistotou lze můžeme říci, že je aspartam zcela bezpečný [2, 22, 24, 73, 74, 76-78].

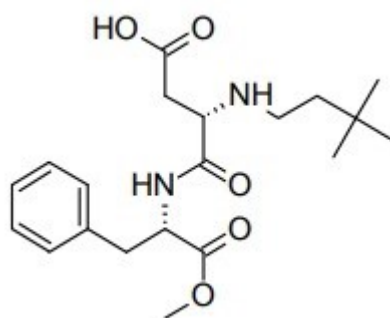


Obrázek 3: Chemická struktura aspartamu [75]

2.2.1.3 Neotam

Neotam (NEO) se skládá stejně jako aspartam z aminokyselin fenylalaninu a kys. asparagové. Získává se N-alkylací aspartamu. Jeho účinky jsou však odlišné. Strukturu neotamu je možno vidět na obrázku 4. Neotam se pyšní extrémní sladivostí. Je asi 30x sladší než aspartam a zhruba 7000-13000x sladší než sacharóza. Proto se používá pouze ve velmi

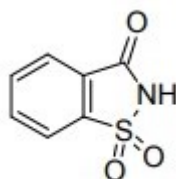
malých dávkách. Na rozdíl od aspartamu je termostabilní. Může se tedy použít při pečení nebo dalších tepelných úpravách. Až 30 % neotamu se v těle metabolizuje především na methanol, ale jedná se o velmi malé množství, které běžně přijímáme v klasické stravě. Velice malé množství neotamu se přemění na fenylalanin, ale i lidé s fenylketonurií ho bez obav mohou používat. Použití neotamu je schváleno jak v EU, tak v USA [2, 22, 24, 73, 79].



Obrázek 4: Chemická struktura neotamu [75]

2.2.1.4 Sacharin

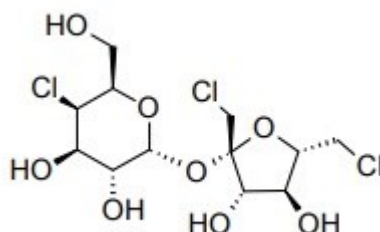
Sacharin (SAC) byl objeven již v roce 1878 a řadí se mezi nejstarší sladidla. Naším trávicím traktem prochází v nezměněné podobě a neobsahuje žádné kalorie. Je zhruba 300-400x sladší než sacharóza. Byl hojně používán ve 20. století během obou světových válek, kdy byl nedostatek cukru. To pravděpodobně pomohlo k jeho rozsáhlému používání a oblibě veřejnosti. Některé studie tvrdí, že způsobuje rakovinu močového měchýře [2, 22]. Studie však byly prováděny s extrémními dávkami sladidla po dlouhou dobu. Přesněji je to popsáno v kapitole 2.1 a tyto výzkumy nejsou přenositelné na lidskou populaci. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny řadí sacharin do skupiny 3, kam patří nekarcinogenní látky pro člověka. Sacharin je považován za bezpečné sladidlo, a proto je i schválen. Jeho struktura je uvedena na obrázku 5 [2, 22, 73, 74, 78].



Obrázek 5: Chemická struktura sacharinu [75]

2.2.1.5 Sukralóza

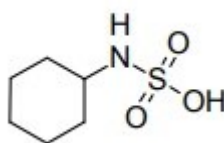
Sukralóza (SUC) byla objevena roku 1976. Je vyráběna chlorinací sacharózy náhradou tří atomů chloru za tři hydroxylové skupiny (obrázek 6). Na výrobcích ji lze najít pod označením E 955 a komerčně bývá nabízena pod názvem Splenda. Sukralóza je 320-1000x sladší než cukr a neobsahuje žádné kalorie. Je velmi dobře rozpustná ve vodě a stabilní v širokém rozmezí pH a teploty. Považuje se za bezpečné sladidlo pro všechny okruhy obyvatel. V poslední době se však ukazuje, že může mít negativní vliv na naše střevní bakterie, ale k definitivním závěrům je stále potřeba více studií na lidech [2, 4, 22, 73, 74, 78].



Obrázek 6: Chemická struktura sukralózy [75]

2.2.1.6 Cyklamát

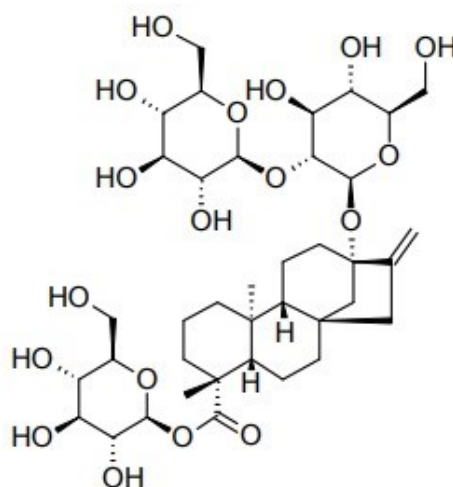
Cyklamát (CYC) byl objeven v roce 1937 při hledání léku proti horečce. Cyklamát má sladivost 30-50x větší než sacharóza a hořkou chuť, která mizí synergickými účinky ve směsi se sacharinem. Je rozpustný ve vodě a rozpustnost lze zvýšit přípravou sodné nebo vápenaté soli. Patří mezi termostabilní látky a jeho struktura je uvedena na obrázku 7. V minulosti byl spojován s rakovinou močového měchýře podobně jako sacharin. Pozdější studie karcinogenitu vyvrátily. Nicméně každý člověk reaguje na příjem cyklamátu odlišně. Někteří lidé ho vyloučí v nezměněné formě, u jiných lidí může dojít ke konverzi cyklamátu střevními bakteriemi na toxický metabolit cykloheximid. Z tohoto hlediska je považován za jeden z nejkontroverznějších a nejproblematictějších umělých sladidel. V USA je jeho používání zakázáno, v EU je však povolen [2, 22, 24, 73].



Obrázek 7: Chemická struktura kyseliny cyklamové [75]

2.2.1.7 Steviol-glykosidy (Stévie)

Stévie je přírodní bylina. Steviol-glykosidy jsou průmyslově získávány z listů rostliny *Stevia rebaudiana*. Kromě steviosidu se zde nachází i rebaudiosid A, rebaudiosid C, dulkosid a další sloučeniny. V listech tvoří až 15 % sušiny. Steviosid (STV) následovaný rebaudiosidem A jsou dva nejvýznamnější a nejčastěji používaná sladidla se steviolovým jádrem. Rebaudiosid je dokonce 250-450x sladší než sacharóza bez vedlejších chutí, zatímco steviosid je 300x sladší než sacharóza a má mírnou hořkou pachut'. V sumárních směsích je 80-90 % steviosidu, zbytek je tvořen převážně rebaudiosidy. Steviol-glykosidy jsou komplexní molekuly, které obsahují 13-hydroxykaur-16-en-18-onovou kyselinu (steviol), na které je navázán různý počet glukózových jednotek (obrázek 8). Stévie je v EU poměrně novým sladidlem, protože byla schválena až v roce 2011. V Jižní Americe se však listy používají několik století a v Japonsku už více než 40 let. Její použití je vhodné k tepelné úpravě, jelikož je stabilní až do 198 °C. Obsahuje pouze zanedbatelné množství energie. Steviol-glykosidy jsou hydrolyzovány střevní mikroflórou na steviol, který je v játrech konjugován s glukuronidem a poté vylučován zejména močí. Stévie se často označuje jako čisté přírodní sladidlo, ale pro potravinářský průmysl jsou steviol-glykosidy získávány ze sklizených listů stévie složitým fyzikálně-chemickým procesem. Sladí se extrakčně získaným bílým práškem nebo práškem z rozemletých usušených listů. Konzumace steviol-glykosidů je bezpečná. Nicméně bychom neměli překračovat hodnotu 4 mg/kg tělesné hmotnosti na den. Vhodná je pro pacienty s fenylketonurií i pro diabetiky. Má antifugální, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Snižuje krevní tlak, LDL cholesterol, riziko aterosklerózy a diabetu 2. typu. Dnes se široce používá k výrobě cukrovinek, čokolády, pečiva, zmrzliny, jogurtů, nápojů, proteinových doplňků a omáček [2, 22, 24, 31, 72-75, 80, 81].



Obrázek 8: Chemická struktura steviosidu [75]

2.2.1.8 Thaumatin

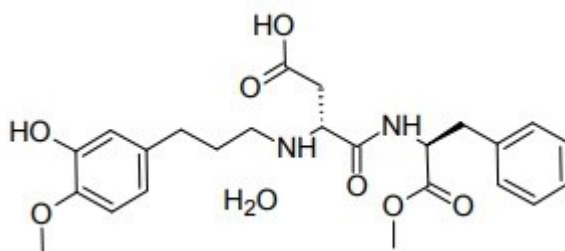
Proteiny se sladkou chutí se přirozeně vyskytují v některých exotických rostlinách. Thaumatin je směs šesti úzce provázaných proteinů: thaumatinu a, b, c, I, II a III, extrahovaných z ovoce *Thaumatococcus daniellii* (Benth) pocházejícího ze západní Afriky. Hlavními složkami jsou thaumatin I a II, ale i další izoformy mají sladkou chuť. V plodech se thaumatin vytváří jako odezva na napadení rostliny viroidy. Thaumatin je dobře rozpustný ve vodě, odolává vysoké teplotě a kyselému pH. Sladivost je zhruba 1600-3000x vyšší než u sacharózy. Jeho sladká chuť se značně liší od chuti cukru. Hlavním problémem je pozdní nástup účinku, vjem chuti však trvá dlouho a ve vysokých dávkách je cítit mírná pachůť lékořice. Nedoporučuje se používat ho ve velkých dávkách, ale v kombinaci s jinými sladidly funguje velice dobře, protože zesiluje jejich chuť. Metabolismus thaumatinu je podobný metabolismu jakéhokoli jiného proteinu v lidské stravě. Obsahuje 4 kcal/ g, což je zanedbatelné kvůli nízkým dávkám. Doporučený denní příjem je teprve předmětem zkoumání, protože nebyl dostatečně toxikologicky prozkoumán a existuje riziko alergických reakcí. Nicméně je povolen jak v EU, tak v USA, kde je FDA označen jako GRAS (obecně považován za bezpečný). Současná produkce neuspokojuje poptávku a stále rostou alternativní způsoby produkce thaumatinu prostřednictvím mikroorganismů a transgenních rostlin. Dnes se často používá u zpracované zeleniny, omáček, polévek, produktů pocházejících z vajec, drůbeže, ovocných šťáv a žvýkaček. Dále je látka používána k výrobě zubních past, vitamínových přípravků a krmiv pro zvířata [31, 82, 83].

2.2.1.9 Extrakty Luo Han Guo

Sladké plody rostliny *Siraitia grosvenorii* neboli malé oválné ovoce Luo Han Guo roste v jižní Číně a severním Thajsku. Používá se jako sladidlo a funkční přísada v tradiční čínské medicíně. Buddhističtí mniši ovoce pěstovali pro své léčivé vlastnosti, proto se mu říká ovoce mnicha nebo Budhova koule. Koncentrát z tohoto ovoce má statut GRAS. Jde o první sladidlo na bázi ovocného koncentrátu s nulovou energetickou hodnotou, který je schválen FDA. Ovocný koncentrát obsahuje sloučeniny přirozeně se vyskytující v ovoci se sladivostí 300x vyšší než cukr. Osm čajových lžiček cukru může být nahrazeno pouze čtvrtinou gramu tohoto koncentrátu [69, 73, 84].

2.2.1.10 Advantam

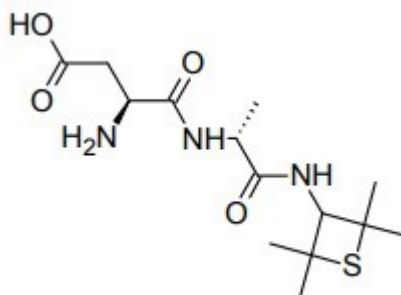
Advantam je dalším derivátem aspartamu. Jako potravinářská přídatná látka má číslo E 969. Přesně se jedná o N-[N-[3-(3-hydroxy-4-methoxyfenyl)propyl]-L- α -aspartyl]-L-fenyl-alaninu), jehož struktura je na obrázku 9. Je dokonce 20 000x sladší než sacharóza. Má podobnou chuť jako aspartam. V těle je z části absorbován v gastrointestinálním traktu, ale převážně je vylučován stolicí. Toxicita byla studována laboratorními pokusy u myší, krys, králíků i psů a nebyla prokázána. Jediným pozorovaným jevem bylo snížení hmotnosti pokusných zvířat. Lze ho tedy považovat za bezpečný. EFSA posoudil bezpečnost advantamu a stanovil přijatelný denní limit na 5 mg/kg tělesné hmotnosti na den [24, 75, 85].



Obrázek 9: Chemická struktura advantamu [75]

2.2.1.11 Alitam

Alitam (ALI) je intenzivní sladidlo se silou sladkosti 2000x vyšší než sacharóza. Vyvinula ho firma Pfizer. Je 10x sladší než aspartam a oproti němu nemá žádnou nepříjemnou dochuť. Proto by měl v budoucnu nalézt větší využití v potravinářském průmyslu. Alitam je v těle hydrolyzován na asparagovou kyselinu, která je normálně metabolizována. Dále pak na D-alaninamidovou část molekuly, která je z těla vylučována beze změny. Na rozdíl od aspartamu neobsahuje fenylalanin, a tak ho mohou konzumovat osoby s fenylketonurií. Doporučená denní dávka byla stanovena na 1 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Jeho použití je povoleno v Mexiku, Austrálii, Číně a na Novém Zélandu. V ČR, EU, ani USA zatím povoleno není. Jeho struktura je uvedena na obrázku 10 [75, 86].



Obrázek 10: Chemická struktura alitamu [75]

2.2.2 Výživová umělá sladidla

2.2.2.1 Cukerné alkoholy (polyoly)

Cukerné alkoholy jsou málo stravitelné uhlohydráty, které se přirozeně vyskytují v ovoci, zelenině, houbách a řasách. Jsou to látky, které nepatří ani mezi cukry, ani mezi nízkokalorická sladidla. V posledních letech se často používají jako alternativní druh sladidel. Jejich sladivost je zhruba 60-70 % oproti sacharóze. Mezi cukerné alkoholy povolené v potravinářství jako výživová nebo objemová sladidla patří maltitol, mannitol, sorbitol, xylitol, erythritol, isomalt a laktitol. Jejich kalorická hodnota se pohybuje okolo 10 kJ/g (2,4 kcal/g). Výjimkou je erythritol s nulovou energetickou hodnotou. Jde však o energii, která se uvolní až po naštěpení cukerných alkoholů střevními bakteriemi (erythritol tomuto štěpení nepodléhá). Fungují jako potrava pro střevní bakterie a mají probiotické účinky. Jejich funkce je v tomto podobná vláknině. Získávají se katalytickou hydrogenací z příslušných cukrů. Mannitol, sorbitol a maltitol se snadno extrahují z hnědých řas. U erythritolu se používá metoda založená na fermentaci nebo enzymatické přeměně s osmofilními kvasinkami a houbami. Oproti klasickému cukru nezpůsobují zubní kaz a mají nižší GI a obsah kalorií, což je opět výhoda pro diabetiky. Často se používají spolu s nekalorickými sladidly, aby maskovali jejich nahořklou chuť nebo jim propůjčili objemovou hodnotu. Polyoly nejsou úplně tráveny a jejich nadměrné použití může vést ke střevním potížím, nadýmání a plynatosti. Nejlépe je tolerován erythritol díky tomu, že jako jediný z cukerných alkoholů není štěpen střevními bakteriemi. Kromě tohoto vedlejšího účinku nevykazují žádné další zdravotní problémy a lze je považovat za bezpečné. Nejčastěji používané jsou xylitol, erythritol a maltitol. Jsou vhodnou náhradou cukru, a to zejména tehdy, když ho chceme nahradit v poměru 1:1. Typickým příkladem je pečení, kdy by nám při použití nízkokalorických sladidel chyběl objem, který v původním receptu zastával cukr. Při použití cukerných alkoholů zůstane sladivost na zhruba 70 % a objem stejný [5, 24, 31, 73, 74].

2.3 Alternativy umělých sladidel

2.3.1.1 Agávový sirup

Agávový sirup je vysoce průmyslově upravovaný produkt, který se získává ze sukulentů rostoucích v Jižní Americe. Má GI pouze na hodnotě 15. Avšak po zpracování tento sirup obsahuje přes 75 % fruktózy, což je více než u HFCS. Negativní vlivy zvýšeného příjmu fruktózy jsou popsány v kapitole 1.2.3. Agávový sirup je omylem zdravé výživy a nelze ho doporučit jako sladidlo [4, 87].

2.3.1.2 Datle

Mají vysoký obsah cukrů a hodí se spíše ke slazení než k přímé konzumaci. Po krátkém namočení je možné datle rozmixovat na pastu, kterou lze sladit nejrůznější druhy potravin. Krom toho obsahují dostatečné množství vlákniny a minerálních látek. Českou alternativou jsou sladidla ze sušeného ovoce. Ze sušených rozemletých hrušek se sladily frgále [4, 87].

2.3.1.3 Glukózový sirup

Je vyráběn z kukuřice, brambor i rýže. Používá se především k výrobě sladkostí. Obsahuje dominantně glukózu, ale sirup na rozdíl od samotné glukózy má GI 75 [4, 87].

2.3.1.4 Javorový sirup

Vyrábí se rafinací šťávy z javoru. Primárně obsahuje vodu a sacharózu s různým množstvím aminokyselin, organických kyselin a fenolických látek, které se koncentrují zahříváním za vzniku široké škály aromatických látek. Z mikroživin se zde nachází železo, vápník a mangan. Má nízký obsah glukózy a GI okolo 60. Ze sirupů patří k nejlepším možnostem [4, 31, 87].

2.3.1.5 Med

Je jedním z nejstarších přírodních sladidel. Skládá se z velké části z glukózy a fruktózy. Je sladší než cukr a je jediným sladidlem získaným ze živočišných zdrojů. Med přirozeně obsahuje cenné mikroživiny. Vyskytuje se zde hořčík, železo, draslík, zinek, vápník a selen. Pasterací se však některé z těchto živin ničí [4, 31, 87].

2.3.1.6 Melasa

Melasa je sladká a nutričně bohatá šťáva, která je vedlejším produktem výroby cukru z cukrové třtiny. Šťáva se koncentruje vařením a cukr se krystaluje a odstředuje. Tento proces se několikrát opakuje až vznikne hustý tmavý sirup, který je zbaven většiny cukru. Obsah cukru v melase se liší od 20 do 60 %. Obsahuje všechny cenné látky z cukrové třtiny, 3 % bílkovin, malé množství vitamínů B a kyseliny pantotenové. Je jedním z nejbohatších rostlinných zdrojů železa, ale obsahuje i fosfor, hořčík, zinek, vápník, draslík a chrom. Nevýhodou může být znečištění zbytky agrochemikálií [4, 31, 87].

2.3.1.7 Palmový a kokosový cukr

Palmový cukr se vyrábí ze šťávy stromů, kokosový cukr z mízy květu kokosové palmy (*Cocos nucifera* L.). Oba obsahují sacharózu a GI mají cca 35. Najdeme zde i minerální látky jako vápník, draslík, železo a zinek. Vyskytují se zde i krátké řetězce mastných kyselin a antioxidanty. Kokosový cukr má těchto mikroživin o trochu více. Mimořádný je zde výskyt inulinu, což je vláknina, která může zpomalovat přechod cukru do krve. Z hlediska výživy však obsahují stejné množství kalorií jako obyčejný cukr. K získání smysluplného množství mikroživin by bylo nutné spořádat velké množství těchto cukrů. Ve výsledku je sladivost nižší, cena vysoká a výživová hodnota pochybná [4, 31, 87].

2.3.1.8 Sladěnka a obilné slady

Obsahují maltózu, což je disacharid složený z dvou glukózových jednotek. Dále se zde nachází minerální látky jako vápník, draslík, železo, hořčík, fosfor, měď a zinek. Sladěnka se získává extrakcí z ječmene a má konzistenci hustého medu. Chutná méně sladce než glukóza, ale má vyšší GI a proto je méně prospěšný [4, 87].

2.3.1.9 Sušené ovoce

Sušené ovoce je asi tou nejlepší možnou variantou, jak si osladit dezerty a další pokrmy. Jakékoli sladké ovoce je možné namočit na chvíli do vody a po změknutí nasekat, nastrohat nebo rozmixovat jako sladkou polevu [4, 87].

2.3.1.10 Čekankový sirup

Jde o mimořádné sladidlo v tom smyslu, že sladkou složku zde zastává inulin, což je rozpustná vláknina ve vodě mající sladkou chuť. Je to polymer složený z několika set jednotek fruktózy zakončený molekulou glukózy. Konzumací inulinu podpoříme střevní mikroflóru, doplníme vlákninu a elegantně nahradíme cukr. Podle druhu obsahuje pouhých 5-13 % cukru, což je oproti ostatním sirupům výrazný rozdíl. Ve srovnání se sacharózou má třetinový podíl kalorií a podstatně nižší GI. Nenatrávený prochází žaludkem a tenkým střevem. V tlustém střevě ho rozkládají bakterie. Během kvašení vznikají mastné kyseliny s krátkými řetězci, ale také oxid uhličitý, vodík a methan. Tvorba těchto plynů střevními bakteriemi je jeho jedinou nevýhodou, protože může způsobit nadýmání.

3 Metody analýzy umělých sladidel v potravinách

Obsah sladidel v jednotlivých potravinách je omezen zvláštními předpisy dané země. Než se smí sladidla v EU používat, tak EFSA důkladně posuzuje jejich bezpečnost. Směrnice EU 94/35/ES [88], 96/83/ES [89], 2003/115/ES [90], 2006/52/ES [91] jasně definují, která sladidla mají povolení se přidávat do potravin a nápojů. Z důvodu bezpečnosti spotřebitele je nutné obsah sladidel v potravinách kontrolovat. K získání těchto informací jsou nutné spolehlivé kvalitativní a kvantitativní metody analýzy pro měření sladidel v širokém spektru potravinových matric. K jejich stanovení je k dispozici mnoho analytických metod založených na různých principech [92, 93].

Mezi používané metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [94-109], iontová chromatografie (IC) [110, 111], tenkovrstvá chromatografie (TLC) [112, 113], plynová chromatografie (GC) [114], kapilární elektroforéza (CE) [115, 116], injekční průtoková analýza (FIA) [117], elektroanalytické techniky [118], techniky s pomocí dvouvrstevných lipidových membrán [119] a spektroskopické techniky [120-122]. Většina z nich je však vhodná pouze pro stanovení jednoho sladidla nebo určení sladidla z jednoho typu vzorku [92, 93].

3.1 Úprava vzorku před analýzou

Příprava vzorků je nezbytnou fází analytického procesu a vzorky potravin patří mezi nejobtížnější matrice kvůli velké variabilitě jejich složení. Tuto variabilitu ve složení můžeme minimalizovat správnou přípravou vzorku. Obecně příprava vzorku zahrnuje čtyři kroky: homogenizaci, extrakci, přečištění a případné zakoncentrování. Optimální přípravou vzorku se může zkrátit čas analýzy, eliminovat zdroje chyb, zvýšit citlivost a umožnit jednoznačnou identifikaci, potvrzení a kvantifikaci analytů [92].

Sladidla se běžně používají v různých druzích potravin: nealkoholické nápoje, ovocné nápoje, fermentované mléčné nápoje, instantní práškové nápoje, bonbóny, žvýkačky, pevná a tekutá sladidla, džemy, okurky, konzervované ovoce, sušené ovoce, omáčky, dehydratované polévky, želé, pekárenské výrobky, mléčné výrobky, cukrovinky a čokolády [92].

3.1.1 Extrakce

Mnoho potravinářských výrobků jsou směsi obsahující různé organické (lipidy, bílkoviny, sacharidy, barviva, vitamíny, konzervanty atd.) a anorganické (voda, minerály atd.) přísady. Některé tyto látky z matrice mohou ovlivnit stanovení sladidel, což způsobuje zesílení

nebo zeslabení signálu detektoru. To obvykle vede ke zvýšení meze detekce metody. Nepřečištěné extrakty surového vzorku dlouhodobě zanáší HPLC/MS instrumentaci, a proto je čištění extraktu zásadní k udržení analytického systému v nejlepším stavu po co nejdelší dobu. Zvláště pak v případech, kdy je systém používán pro rutinní analýzu. Pro tento účel se používá extrakce kapalina-kapalina [104], srážení, filtrace, dialýza [99-101] a extrakce SPE [93, 96, 97, 100, 103, 105, 107, 109, 123, 124].

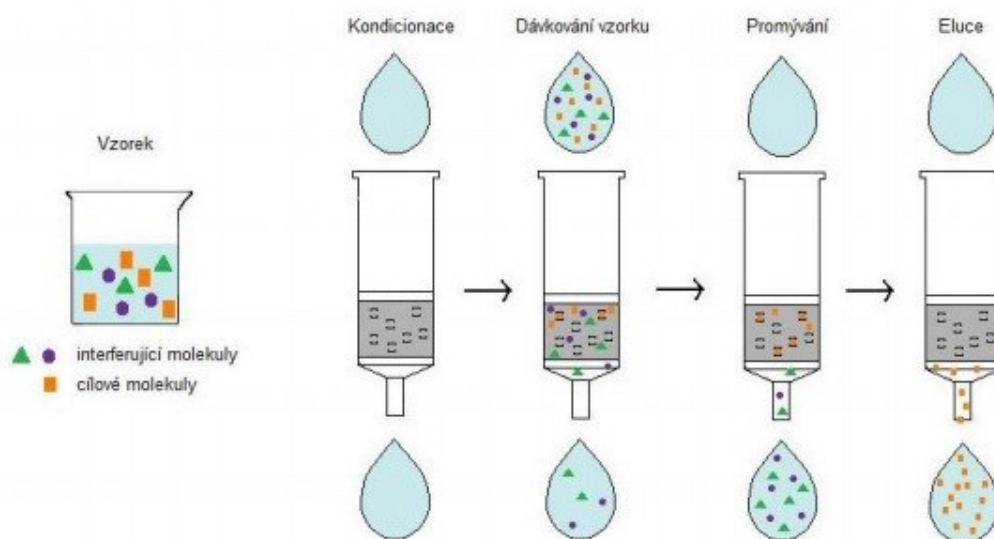
K extrakci umělých sladidel z matrice se volí extrakční rozpouštědlo podle povahy, rozpustnosti příslušného sladidla a s ohledem na extrahovaný materiál a další zpracování extraktu. Některé vzorky jako nápoje, práškové nápoje, sirupy, džusy, pevná a tekutá sladidla lze jednoduše rozpustit ve vodě, pufru [93] nebo organickém rozpouštědle jako methanol a acetonitril (ACN) [125], případně v jejich roztocích s vodou či pufrem [96-99, 101, 102, 104-106, 124-126]. K těmto směsím nebo přímo do pufrů se často přidávají kyselina mravenčí a octová [93]. V případě sycených nápojů musí být vzorky před analýzou odplyněny [92, 93, 96].

Složitější vzorky jako jogurty, rybí výrobky, kandované a konzervované ovoce, koláče a další musí být nejdříve homogenizovány, následně ředěny a alespoň na 10 minut uloženy do ultrazvukové lázně [93, 96]. Vzorky obsahující bílkoviny, slizovité a mastné částice je vhodné vyčeřit pomocí Carrezovova činidla [92].

Všechny vzorky musí být alespoň jednou zfiltrovány přes membránový filtr k odstranění jemných nečistot [92]. Je žádoucí využít i centrifugace k odstranění pevných částí matrice [92, 93, 98, 127, 128]. Následně se supernatant izoluje a analyzuje [96, 98, 127] nebo jsou použity další čisticí kroky, jako například extrakce tuhou fází (SPE) [93, 124].

3.1.2 Extrakce tuhou fází

Čištění vzorků založené na SPE se zdá být nejlepším řešením pro přečištění vzorku a v některých případech i k zakoncentrování. Extrakce je jednoduchá, přiměřeně rychlá a levná a poskytuje reprodukovatelné výsledky. Další výhodou je nižší spotřeba organických rozpouštědel oproti jiným metodám a kompatibilita s velkým množstvím instrumentálních technik používaných při analýze potravin. Samozřejmě jsou možné i jiné postupy čištění vzorku, ale obvykle jsou vysoce specifické pro studovaný analyt, vzorek nebo použitou techniku konečného stanovení [92, 129]. Schéma extrakce na pevné fázi je uvedeno na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma extrakce na pevné fázi (SPE) [130]

Proces extrakce na SPE kolonce zahrnuje kondicionování (předúpravu) kolonky, dávkování vzorku, promytí kolonky a eluci analytů. Interferující látky by měly být zadržovány velmi silně nebo vůbec. Slabě zadržované látky mohou být snadno odstraněny z kolonky během plnění vzorku nebo při promývání, naopak látky mající silnou afinitu k sorbentu zůstávají adsorbovány uvnitř patrony i po promytí cílových analytů během elučního kroku [92, 129, 130].

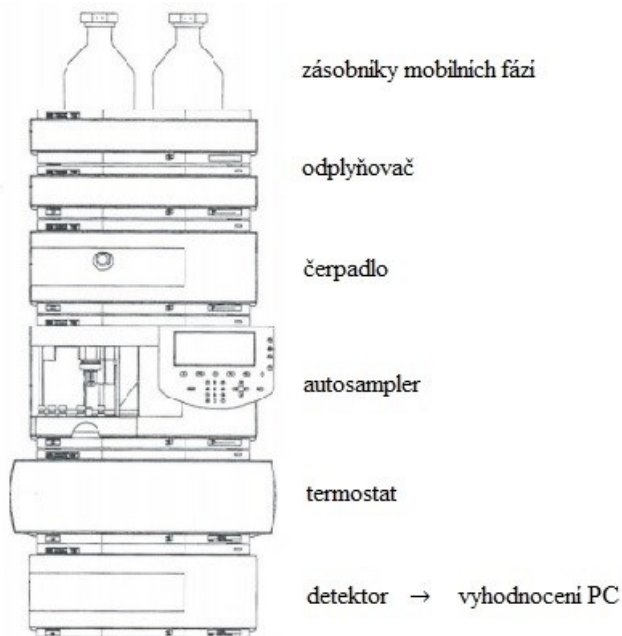
Technika extrakce na pevné fázi umožňuje frakcionaci složek vzorku na základě afinity sloučeniny nebo skupiny sloučenin ke stacionární fázi. Pro úspěšnost extrakce musí mít analyt vyšší afinitu k tuhé fázi než k matrici vzorku. Lze ji považovat za kapalinovou chromatografii s nízkým rozlišením. Mezi velkým počtem SPE kolonek dostupných na trhu se nejčastěji používají s chemicky vázanou nepolární stacionární fází (nejčastěji oktadecylsilikagel – C18) [92, 129, 130].

Porovnáním účinnosti extrakce sladidel s různými komerčně dostupnými SPE kolonkami se zabývalo velké množství studií [93, 103, 105, 109, 124, 131, 132]. Nejlepší účinnost vykazovaly kolonky se sorbenty na principu systémů s obrácenými fázemi [93, 105, 132]. Zejména kolonky Strata-X [93, 105] a Oasis HLB [103, 105, 109, 124] poskytovaly vysoké výtěžnosti. Výtěžnost sladidel na SPE kolonkách silně závisí také na složení vzorku, proto správnou volbou pufru a pH můžeme ovlivnit účinnost zadržení sladidel na kolonce. Ve studii [131] byly testovány různé octanové a mravenčanové pufrů při několika hodnotách pH, které byly použity jako rozpouštědlo, kondicionační i promývací roztok. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u pufru složeného z kyseliny mravenčí

a N,N-diisopropylethylaminu (pH 4,5) [93, 131]. Umělá sladidla se z kolonky poté eluovala methanolem nebo vodným roztokem methanolu [105, 131, 132]. U kolon s iontovou výměnou může být methanol obohacen amoniakem nebo kyselinou mravenčí [105, 132]. Eluát je následně naředit mobilní fází pro analýzu HPLC a ihned analyzován [93, 131] nebo odpařen v proudu N₂ a před analýzou znovu rozpuštěn [105, 107].

3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je moderní separační technika, která vyniká schopností separovat složité směsi látek v krátkém čase s vysokou efektivitou. Principem je rozdělování složek mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fázi umístěnou v koloně. Kolony jsou plněny stacionární fází o velikosti částic 3-7 μm . Pokud jsou částice menší, než 2 μm jedná se o ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC), kde je nutné využít speciálního zařízení, protože při průchodu mobilní fáze kolonou dochází k velkému odporu a je potřeba použít vysokotlaká čerpadla, která odolávají tlakům až 150 MPa, na rozdíl od běžných chromatografických systémů, kde stačí použít čerpadla pro tlaky v rozmezí 30-60 MPa. Schéma chromatografického systému je možno vidět na obrázku 12 [129, 130, 133-137].



Obrázek 12: Schéma kapalinového chromatografu [138]

Mobilní fáze jsou čerpány vysokotlakými, zpravidla pístovými čerpadly. Dále procházejí přes odplyňovač a v případě gradientové eluce směšovačem mobilních fází, který

mobilní fáze smíchá podle nastaveného poměru. Vzorek je dávkován do mobilní fáze většinou přes šesticečný dávkovací ventil (manuálně) nebo pomocí autosampleru (automaticky). Poté je unášen do chromatografické kolony umístěné v termostatu, která má jasně definovanou délku, vnitřní průměr a náplň. Na chromatografické koloně dochází k dělení analytů na základě opakované distribuce vzorku mezi kapalnou mobilní a tuhous stacionární fází. Během dělení analytů dochází k mnoha typům vzájemných interakcí mezi molekulami stacionární fáze, mobilní fáze a molekulami vzorku. Volbou mobilní a stacionární fáze můžeme ovlivnit proces separace a měnit tím eluci separovaných složek. Na závěr složky vzorku putují do detektoru a získaná data se vyhodnocují pomocí počítače [129, 130, 133-137].

3.2.1 Fázové systémy v HPLC

3.2.1.1 Chromatografie v systémech s normálními fázemi

U chromatografie v systémech s normálními fázemi (NP-HPLC) se používá polárnější stacionární fáze, než je fáze mobilní. Je vhodná především k dělení polárních látek. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá silikagel nebo chemicky modifikovaný silikagel pomocí aminopropylové, kyanopropylové, diolové či jiné polární skupiny. Jako mobilní fáze se používá nepolární rozpouštědlo (např. hexan, heptan) s přídavkem polárního modifikátoru (propan-2-ol). Polární analyty mají vyšší afinitu k polární stacionární fázi oproti nepolárním látkám, které eluují dříve [130, 133-135, 137].

3.2.1.2 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi

V systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) můžeme separovat látky jak nepolární, tak polární. U tohoto systému je mobilní fáze polárnější než stacionární fáze a v drtivé většině se používá chemicky vázaný oktadecylsilikagel (C18). Kromě C18 stacionárních fází lze využít i další chemicky vázané nepolární fáze jako butyl, oktyl, fenyl, alkylfenyl, kyanopropyl, pyridyl, nitril, nebo dlouhé řetězce alkylů (C30). Dále lze využít polymerní sorbenty s hydrofobním povrchem. Jako mobilní fáze se nejčastěji používají směsi vody či pufru s polárními organickými rozpouštědly (methanol či acetonitril). Vysoce polární látky skoro neinteragují se stacionární fází a bývají eluovány nejdříve. S klesající polaritou látek roste jejich retence na stacionární fázi. Při separaci složité směsi látek s různými retenčními faktory je výhodné použít gradientovou eluci, při které dochází během analýzy ke snižování polarity mobilní fáze (přídavkem organické fáze), což umožňuje rychlejší eluci nepolárních látek z kolony [129, 130, 133-135, 138].

3.2.1.3 Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí

Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) byla poprvé definována v roce 1990 Andrewem Alpertem. Dříve byla tato technika považována za spojení NP-LC a RP-LC. HILIC se ukázala jako skvělý nástroj pro separaci polárních sloučenin na polární stacionární fázi (kolony typické pro NP-LC) pomocí polárních rozpouštědel obsahujících vodu jako silný eluční solvent (rozpouštědla podobné s RP-LC). Slovo hydrofilní charakterizuje afinitu k vodě, která se přidává do mobilních fází [130, 139-143].

Hydrofilnější stacionární fáze více poutá vodu z mobilní fáze a analyt se poté rozděluje mezi stacionární fázi bohatší na vodu a mobilní fázi na vodu chudší. Mechanismus HILIC ovlivňují i iontové interakce v závislosti na volbě stacionární fáze, vodíkové vazby a interakce dipól-dipólové. Tyto interakce společně s volbou mobilní a stacionární fáze, povahou analytu a jejich vzájemného působení ovlivňují separaci HILIC, avšak přesný mechanismus separace je neustále předmětem zkoumání. Separace se provádějí v isokratickém režimu s vysokým procentem organického rozpouštědla nebo v gradientovém režimu, kdy se zvyšuje podíl vody jako silnějšího elučního rozpouštědla [130, 139-144].

K separaci se může použít téměř jakákoli polární stacionární fáze, nejčastěji silikagel či silikagel chemicky modifikovaný různými polárními funkčními skupinami (aminopropylóvými, amidovými, nitrilovými, karbamátovými, diolovými, kyanopropylóvými, polyethylenaminovými, polyethylenglykolovými nebo polyhydroxylovými skupinami). Dále se využívají stacionární fáze na bázi polymeru nebo iontoměničce. Některé kolony byly vyvinuty speciálně pro HILIC aplikace. Mezi ně patří například stacionární fáze na bázi polyimidu kyseliny jantarové, polymerní kolony s chemicky vázanými amidickými, fosforylcholinovými či zwitteriontovými sulfobetainovými skupinami. Zwitteriontové kolony jsou známé pod názvem ZIC-HILIC a obsahují silně kyselé skupiny kyseliny sulfonové, ale i silně bazické kvartérní amoniové skupiny. Můžeme jimi analyzovat jak látky kyselé, bazické, tak i neutrální. Styren-divinylbenzenovými pryskyřicemi můžeme dělit neutrální látky ve smíšeném režimu aniontové a kationtové výměny. Při jejich použití můžeme dosáhnout specifické selektivity. Velice slibným materiálem je silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem, kde jsou silanolové skupiny (-Si-OH) nahrazeny hydridovými skupinami (-Si-H), případně modifikovány méně polárními skupinami (C18, cholesterol, kyselina undekanová). I když počet komerčně dostupných kolon určených speciálně pro HILIC roste, stále neexistuje žádná univerzální stacionární fáze jako C18 v RP-HPLC, protože při měření na jedné HILIC koloně při použití různých mobilních fází můžeme dosáhnout naprosto odlišné selektivity separace [130, 139-143].

Mobilní fáze v HILIC dominantně obsahují vysoké koncentrace acetonitrilu (60-97 %) a nízké koncentrace vody (3-40 %). Výhodou těchto mobilních fází je nízká viskozita a malý zpětný tlak i při použití poměrně dlouhých kolon. Při použití nižších koncentrací acetonitrilu se mění mechanismus retence a chromatografické chování látek odpovídá separacím v RP-HPLC. Nicméně je možné použít i další organická rozpouštědla jako isopropanol, methanol, ethanol, tetrahydrofuran, aceton a 1,2-ethandiol. V podstatě lze použít téměř všechny vodně-organické fáze. K mobilní fázi se často přidávají pufrů (octan a mravenčan amonný), které upravují pH a iontovou sílu mobilní fáze. Retence se zvyšuje s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polaritu mobilní fáze (s rostoucím podílem vody nebo pufru) [130, 139-143].

HILIC má oproti NP-HPLC a RP-HPLC mnoho výhod. Je vhodný pro analýzu vysoce polárních sloučenin, které se v systému RP-HPLC eluují v těsné blízkosti mrtvého objemu kolony a snadno se rozpouštějí v použité mobilní fázi, což neplatí u NP-HPLC. HILIC je ideální pro spojení s hmotnostní spektrometrií, a to především při použití elektrospreje, protože vysoký podíl organického rozpouštědla v mobilní fázi vede k rychlému odpařování rozpouštědla během ionizace. HILIC může nabídnout až desetinásobné zvýšení citlivosti oproti RP-HPLC a měla by být považována za alternativu tohoto nejčastěji používaného chromatografického systému [140-142].

3.2.2 Detekce

Detektory identifikují látky vycházejících z chromatografické kolony. Jsou to zařízení, která monitorují změny složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Detektor by měl být vysoce citlivý pro analyzované látky, univerzální pro co nejvíce analytů, lineární v co nejširším rozsahu koncentrací, málo citlivý na změnu složení mobilní fáze, průtoku a na změny teploty a tlaku. Mezi další kladené požadavky patří malý objem průtočné cely, možnost gradientové eluce a dostatečně velký poměr mezi měřenou hodnotou a šumem [138, 145-147].

Problémem stanovení komplexních směsí je to, že jednotlivé složky vzorku mohou mít výrazně odlišné fyzikálně-chemické, elektrochemické a spektrální vlastnosti. Právě takový problém nastává při analýze směsi umělých sladidel, což jsou chemicky zcela rozdílné látky. Pro analýzu sladidel samostatně nebo ve směsi se nejčastěji používá spektrofotometrický detektor (UV) [92, 94, 95, 104, 107], který ale není vhodný pro sladidla bez chromoforu. Dalším slibným detektorem k určení několika sladidel v jedné analýze je detektor rozptylu světla (ELSD) [148]. Mezi ostatní používané detektory patří FTIR [106] a detektor nabitého aerosolu

(CAD) [107]. Nicméně v mnoha případech je žádoucí simultánní stanovení a kvantifikace, kterou nejlépe poskytuje hmotnostní spektrometr (MS) [93, 96-103, 105, 125]. MS si našel dominantní postavení v analýze vzorků se složitými maticemi, jako jsou právě vzorky potravin [93, 138, 145-147].

3.2.2.1 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrické detektory měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm a velikost odezvy je dána Lambert-Beerovým zákonem. Jsou jedny z nejvíce používaných detektorů. Jedním z nejdokonalejších spektrofotometrických detektorů je detektor s fotodiodovým polem (DAD), který je schopný proměřit celé absorpční spektrum (většinou 190-800 nm) v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Jeho výhodou je možnost sestavit chromatogram pro jakoukoli vlnovou délku a porovnat spektra analyzovaných látek se standardy. Dalšími výhodami jsou identifikace poměrů absorbancí při různých vlnových délkách, vysoká rychlost snímání spektra, možnost sdružovat signály a vypočítat čistotu píku. Jeho nevýhodou může být vyšší pořizovací cena [130, 138, 145].

3.2.2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a dalších částí jako je vakuový systém, iontová optika a počítač. Iontový zdroj slouží k zplynění mobilní fáze a převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace). Ionty jsou separovány podle jejich poměru hmotnosti a náboje m/z hmotnostním analyzátozem. Detektor vyhodnotí závislost intenzity signálu na poměru m/z , které se nazývá hmotností spektrum. Spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem umožňuje jednoznačnou identifikaci vzorku, protože k identifikaci látek nám slouží nejen shoda jejich retenčních časů se standardy, ale i hmotnostní spektrum, z kterého jsme schopni stanovit molekulovou hmotnost a další strukturní informace. HPLC/MS nám umožňuje současně analyzovat několik umělých sladidel ve vzorku, což z něj činí nejlepší metodu pro stanovení více sladidel v široké škále potravin [93, 134, 135, 138, 146, 147].

3.2.3 Kvantifikace

Ke zjištění kvantity se používá plocha nebo výška píků. Ke kvantifikaci se nejčastěji využívá metoda kalibrační křivky s komerčně dostupnými standardy jednotlivých sladidel. Často se pro eliminaci vlivu matrice přidává vnitřní standard, který musí být dobře oddělen od všech složek analyzovaného vzorku a měl by být eluován v blízkosti stanovované složky. U spojení HPLC/MS se zpravidla volí deuterované analogy sladidel. Používá se warfarin sodný [96] a deuterovaná sukralóza, která však kvůli omezené dostupnosti a vysoké ceně bývá nahrazena N-(2-methylcyklohexyl) sulfamátem, který má při použití MS lepší odezvu [93]. Kalibrační křivky jsou poté konstruovány vynesemím poměru plochy píku sladidel ku ploše píku vnitřního standardu proti poměru jejich koncentrací. Následně jsou určeny rovnice lineární regrese. Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) jsou určeny na základě poměru signálu k šumu. LOD jako trojnásobný odstup signálu od šumu a LOQ jako desetinásobný odstup signálu od šumu [92, 93, 96-98, 147].

3.3 Analýza umělých sladidel metodou HPLC

Nejčastěji se pro separaci umělých sladidel využívá RP-HPLC s oktadecylsilikagelovou stacionární fází (C18) [93, 95-98, 101, 102, 104, 105, 107, 108, 149-152]. Z dalších chemicky modifikovaných stacionárních fází byla použita oktylová (C8) [103, 150] či aminopropylová fáze [150]. Mobilní fází je směs vody nebo pufru [93-97, 102, 104, 105, 107, 128, 131, 149-152] s organickým rozpouštědlem jako je methanol [95, 105, 107, 137, 150], acetonitril (ACN) [94, 97, 101-104, 151, 152], aceton nebo směsi organických rozpouštědel [93, 96, 98, 131]. Pro úpravu pH se přidávají kyseliny mravenčí, octová [93, 102] nebo trifluoroctová [104]. S použitím acetonitrilu nebyla separace sladidel tak uspokojivá, jako při použití methanolu, jelikož píky měly horší tvar a nedocházelo k jejich dostatečnému rozdělení [150]. Po přidání acetonu do mobilní fáze bylo pozorováno zvýšení účinnosti ionizace [96] a také užší píky pro acesulfam-K, sacharin, aspartam, sukralózu, cyklamát, alitam, neohesperidin DC a neotam [98]. Použití dvou organických složek v mobilní fází (ACN a methanolu) vedlo k lepší separaci analytů ve srovnání se separací dosaženou pouze s jednou organickou složkou [98]. Doba RP-HPLC analýz se zpravidla pohybuje v rozmezí 16-36 minut [93, 96, 98, 105, 131, 150]. Ke zrychlení analýzy a zúžení jednotlivých píků analytů se používá gradientová eluce [93, 96-98, 104, 107, 150]. Při separaci ionizovatelných látek v systému RP-HPLC má vliv na retenční časy hodnota pH. Použitím vyššího pH se celková doba separace zkracuje. Ideálního rozlišení lze dosáhnout v oblastech pH = 3,3 - 4,2. Aspartam je stabilnější při pH = 5, protože při nižších hodnotách dochází k jeho kyselé hydrolyze [137].

V HILIC analýzách byly použity kolony se stacionární fází na bázi silikagelu [105, 123, 124, 126, 153], hydroxyethylamidu [125], amidu [127, 153], BEH [123], sulfobetainu [124], sulfoalkylbetainu [153] a polyethyleniminu [128]. Jako mobilní fáze se v drtivé většině používá směs vody či pufru [123-125, 127, 128, 153] s acetonitrem [105, 123-128, 153]. V některých studiích byl použit i methanol [123, 153]. Přidáním methanolu ke směsi pufr-ACN došlo ke zlepšení signálu pozorovaných analytů. Pravděpodobně je to způsobeno ovlivněním vodíkové vazby, která má vliv na retenci v HILIC [123]. Převládajícím mechanismem separace sladidel v systému HILIC je jejich rozdělení do vodné vrstvy [123]. Zvýšením obsahu vody v mobilní fází dochází k urychlení separace látek, ale snižuje se jejich rozlišení [127]. Se zvýšeným obsahem ACN v mobilní fází dochází k nárůstu retenčních časů ASP a SUC. Výrazné zvýšení jejich retenčního času je pozorováno při koncentraci ACN v mobilní fází nad 85 % (v/v) [128]. Nahrazením octanu amonného mravenčanem amonným ve směsi s ACN došlo u HILIC kolon k mírnému zvýšení signálu téměř u všech analyzovaných látek [123].

Nicméně jeho použitím může dojít ke štěpení píku ACE [105]. Naproti tomu v jiné studii [126] bylo dosaženo lepších výsledků při použití octanu amonného, kde byla pozorována lepší účinnost separace a symetrické píky na třech testovaných HILIC kolonách. Kromě typu použitého pufru hraji roli i jeho koncentrace. Iontová síla totiž silně ovlivňuje retenci některých analytů. U ASP (dipeptid) byl pozorován nárůst retenčního času při zvýšení koncentrace pufru. Změna koncentrace pufru však neovlivňuje retenci sukralózy a u sulfamátů (ACE, CYC a SAC) dochází se zvýšením koncentrace pufru pouze k malému zvýšení retenčního času [153]. Navýšením koncentrace mravenčanu z 5 mmol/l na 10 mmol/l významně neovlivnilo citlivost, ani retenční časy analytů [123]. Obsah pufru nad 10 mmol/l vedl k malým změnám ve tvarech píků a potlačení odezvy. Zvýšený obsah kyseliny octové v ACN (> 0,05 %) měl podobný účinek [126]. Při použití 100 mM mravenčanu amonného došlo ke zvýšení retenčních časů všech analytů s výjimkou ASP [124]. Při koncentraci pod 10 mmol/l byly pozorované deformované píky u ASP, zatímco u koncentrací nad 40 mmol/l docházelo ke snížení citlivosti detekce [153]. U sukralózy a sulfamátů nebyla retence ovlivněna hodnotou pH, zatímco u ASP retence klesala s klesající hodnotou pH. U ZIC HILIC kolony však při snížení pH dochází ke zvětšení retence u sulfamátů [153]. Optimální teplota separace sladidel je 25 °C a s rostoucí teplotou dochází ke zkrácení analýzy [123], k nižšímu rozlišení a deformaci píků [124].

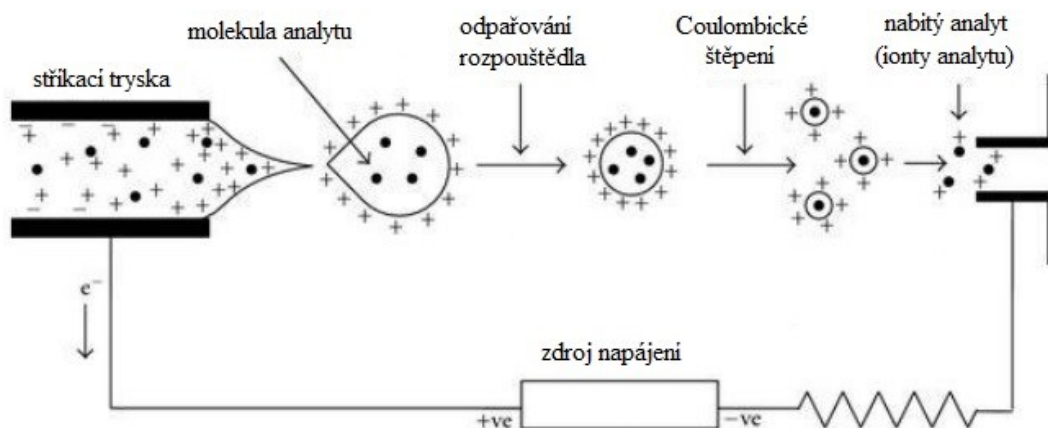
Byla vyzkoušena i kolona se smíšeným režimem Acclaim™ Trinity™ P2, která kombinuje mechanismus HILIC s iontově-výměnnou chromatografií. Optimální koncentrace pufru byla u této kolony stanovena na 40 mmol/l. Nižší koncentrace způsobovala deformaci píků u ACE a SACH a prodlužování separace. Naopak u vyšších koncentrací již nedocházelo ke zlepšení separace sladidel, ani tvarů píků, ale zhoršila se citlivost, pravděpodobně z důvodu omezení tvorby vodíkových vazeb mezi molekulami analytů a stacionární fází [126].

Při porovnání HILIC a RP-HPLC [105, 126] byla pozorována větší účinnost separace v RP-HPLC, zejména u syntetických sladidel [126]. Linearita obou metod byla srovnatelná [105], ale nižších mezí kvantifikace bylo dosaženo u HILIC s výjimkou ASP [105]. Relativní směrodatná odchylka u metody RP-HPLC byla vždy menší než 4 %, kdežto u HILIC analýz dosahovala i 13 %. V HILIC analýze došlo vlivem matrice k velkému potlačení signálu pro SAC a SUC [105].

Z detektorů se standardně ve spojení s HPLC používá spektrofotometrický detektor, který lze využít i pro některá sladidla, jako acesulfam-K, aspartam a sacharin, které mají ve své struktuře chromofor a absorbují záření UV oblasti světla [150]. Acesulfam-K absorbuje v rozmezí vlnových délek 200-260 nm, sacharin při 200-235 nm a aspartam v rozmezí 200-220 nm [150, 151]. Ideální vlnová délka pro stanovení více sladidel dohromady je tedy

210 nm [125, 150, 152]. Cyklamát a sukralózu nelze detekovat pomocí spektrofotometrického detektoru z důvodu absence chromoforu v molekule a pro jejich možnou detekci pomocí spektrofotometrického detektoru je nutná derivatizace. Jako vhodné činidlo pro derivatizaci cyklamátu byl prezentován 4-fluor-7-nitrobenzofuran a pro sukralózu *p*-nitrobenzoylchlorid [92].

Jak již bylo diskutováno, spektrofotometrický detektor není vhodný pro stanovení více sladidel v jedné analýze kvůli absenci chromoforu u některých z nich. Z toho důvodu se pro komplexní analýzu všech sladidel používá citlivý MS detektor. Ionizace vzorku probíhá nejčastěji pomocí elektrospreje (obrázek 13) ve většině případů při záznamu záporných iontů (ESI-) [93, 96-98, 102, 103, 105, 109, 123, 124, 128, 131, 150, 153]. U některých sladidel bylo použito i snímání kladných iontů [103, 125]. Při komplexní analýze směsi sladidel lze využít i přepínání polarity vloženého napětí [98], přičemž u aspartamu, alitamu a neotamu byla pozorována lepší ionizační účinnost v ESI+. Ke kvantitativnímu stanovení sladidel lze využít režim monitorování vybraných iontů (SIM) [96, 97, 128, 131], kde systém propustí na detektor pouze námi zvolený poměr m/z [154], nebo režim monitorování více reakcí (MRM) [98, 102, 105, 125, 150], kde je monitorován nejintenzivnější fragmentový ion. Nejčastěji se MRM využívá u trojitého kvadrupólu, kdy prvním kvadrupólem projde pouze námi definovaná m/z sledovaného analytu. Daný ion je v kolizní cele fragmentován a vzniklý nejintenzivnější iont je vybrán třetím kvadrupólem [154]. V některých případech při ionizaci vznikají adukty, např. u sukralózy vzniká adukt s kyselinou octovou, a intenzita přechodu na molekulární ion je větší než intenzita přechodu z molekulárního iontu na fragmentový iont [98].



Obrázek 13: Ionizace elektrosprejem [138]

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a zařízení

Hmotnostní spektrometr QTRAP 4500	AB SCIEX, USA
Kapalinový chromatograf 1200 series	Agilent Technologies, USA
• Čerpadla mobilní fáze G1312B	Agilent Technologies, USA
• Směšovač mobilní fáze	Agilent Technologies, USA
• Odplyňovač G1379B	Agilent Technologies, USA
• Autosampler G1367C	Agilent Technologies, USA
• Termostat kolon G1316B	Agilent Technologies, USA
Kapalinový chromatograf LC-20AD prominence	Shimadzu, Japonsko
• Čerpadla mobilní fáze LC-20AD	Shimadzu, Japonsko
• Směšovač mobilní fáze	Shimadzu, Japonsko
• Odplyňovač DGU-20A 3R	Shimadzu, Japonsko
• Autosampler SIL-20AC XR	Shimadzu, Japonsko
• Termostat kolon LCO 102	Ecom, ČR
• Detektor diodového pole SPD-M30A	Shimadzu, Japonsko
Kolona Raptor polar 100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm	Restek, USA
Analytické váhy	Sartorius, Německo
Automatické pipety Biohit-Proline	Biohit, Finsko
827 pH lab metr	Metrohm, Švýcarsko
Magnetická míchačka color squid IKAMAG® white	IKA®, Německo
Laboratorní odstředivka 5424	Eppendorf, Německo
Ultrazvuková lázeň K12LEs	Kraintek, Slovensko

4.2 Použité chemikálie

Acenaften	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril LS-MS Chromasolv®	Sigma-Aldrich, USA
Deonizovaná voda (W)	MILI-Q, Merck Milipore, Německo
Kyselina mravenčí (FA) > 98,0 %	TCI Europe, Japan
Kyselina octová ≥ 99,7 %	Sigma Aldrich, USA
Mravenčan amonný ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich, USA
Octan amonný ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich, USA

4.2.1 Standardy sladidel

Acesulfam K $\geq 99,0$ %	Sigma-Aldrich, USA
Aspartam $> 98,0$ %	TCI, Tokyo, Japonsko
N-cyklohexylsulfamát sodný $\geq 99,0$ %	Sigma-Aldrich, USA
Sacharin ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, USA
Sukralosa ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, USA

4.3 Použité vzorky

Vzorek 1: limonáda Coca Cola Zero

Výrobce/distributor: Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o.

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: cyklamát sodný, acesulfam K, aspartam

Vzorek 2: limonáda Pepsi max

Výrobce/distributor: KMV BEV CZ, s.r.o.

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: aspartam, acesulfam K

Vzorek 3: energetický nápoj RedBull sugarfree

Výrobce/distributor: Red Bull GmbH, Rakousko

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: acesulfam K, aspartam

Vzorek 4: iontový nápoj Getorade cool blue

Výrobce/distributor: KMV BEV CZ, s.r.o.

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: sukralóza, acesulfam K

Vzorek 5: energetický nápoj Black horse

Výrobce/distributor: Nealko Oravan, spol. s.r.o.

Zakoupeno: Můj obchod, Pardubice

Obsahuje: acesulfam K, sukralóza, aspartam

Vzorek 6: ústní voda Odol classic

Výrobce/distributor: GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o.

Zakoupeno: Penny, Pardubice

Obsahuje: sacharin sodný

Vzorek 7: šumivý nápoj Bolero raspberry

Výrobce/distributor: Bolero & Co. Ltd., Bulharsko

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: acesulfam K, sukralóza, steviol-glykosidy

Vzorek 8: šumivé tablety Hořčík citron

Výrobce/distributor: Lidl Česká republika v.o.s.

Zakoupeno: Lidl, Pardubice

Obsahuje: sacharin sodný, cyklamát sodný

Vzorek 9: protein Myprotein Clear Whey Isolate, Rainbow candy

Výrobce/distributor:

Zakoupeno: Myprotein, e-shop

Obsahuje: sukralóza, acesulfam K

Vzorek 10: protein Bodylab Whey Protein 100, Salted caramel milkshake

Výrobce/distributor: Bodylab nutrition DK

Zakoupeno: Aktin, e-shop

Obsahuje: sukralóza, acesulfam K

Vzorek 11: ovocné Lízátko bez cukru

Výrobce/distributor: Jiří Šašinka-HORS

Zakoupeno: Kaufland, Pardubice

Obsahuje: sukrolóza, isomalt

Vzorek 12: jogurtový nápoj Skyr

Výrobce/distributor: Zott Polska Sp. z.o.o

Zakoupeno: Lidl, Pardubice

Obsahuje: aspartam, acesulfam K

Vzorek 13: žvýkačky Airwaves, mentol & eukalyptus

Výrobce/distributor: Mars Czech, s.r.o.

Zakoupeno: Penny, Pardubice

Obsahuje: aspartam, acesulfam K, sorbitol, isomalt, manitol,, maltitolový sirup

Vzorek 14: zubní pasta Odol perlička, jahoda

Výrobce/distributor: GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o.

Zakoupeno: Penny, Pardubice

Obsahuje: sacharin sodný, sorbitol

Vzorek 15: zubní pasta Odol cool fresh

Výrobce/distributor: GlaxoSmithKline Consumer Healthcare Czech Republic s.r.o.

Zakoupeno: Penny, Pardubice

Obsahuje: sacharin sodný, sorbitol

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze se skládala ze dvou složek. Vodnou složku mobilní fáze tvořil mravenčanový nebo octanový pufr (koncentrace 5-15 mmol/l) upravený kyselinou mravenčí nebo octovou na pH 3-5. Organickou složku mobilní fáze tvořil čistý acetonitril, případně acetonitril s přísadkou octanu amonného (koncentrace 5-15 mmol/l) rozpuštěného v malém objemu vody v poměru 98 : 2 (ACN : CH₃COOH v H₂O). Mravenčan do ACN přidáván nebyl, protože není v ACN rozpustný. Při optimalizaci separace byl testován vliv koncentrace pufru, pH pufru a obsah ACN v mobilní fázi (účinek hydratace stacionární fáze) na retenci jednotlivých sladidel.

4.4.2 Úprava vzorků

Kapalné vzorky (1-6) byly odplyněny cca 20 min v ultrazvukové lázni. Následně byl odpipetován 1 ml vzorku do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Z takto zředěných vzorků byl odebrán 1 ml do 10 ml odměrné baňky a objem byl doplněn po rysku směsí 10 mM CH₃COOH (pH 5) : ACN (1:1). U vzorku 7 (šumivý nápoj) bylo naváženo 0,6 g a toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml redestilované vody,

což odpovídá doporučené přípravě nápoje na obalu. U vzorku 8 byla rozpuštěna celá tableta ve 200 ml redestilované vody a lizátka (vzorek 11) bylo po navážení rozpuštěno ve 100 ml vody. Pro dokonalé rozpuštění byly vzorky ponechány 20 minut v ultrazvukové lázni a následně byly 1000x naředěny stejným způsobem jako u kapalných vzorků. U vzorků proteinů (vz. 9-10) bylo 0,1 g vzorku rozpuštěno v 5 ml vody a ponecháno 20 min v ultrazvukové lázni. Z tohoto roztoku byl odpipetován 1 ml do 100 ml odměrné baňky, dále bylo přidáno 40 ml redestilované vody a následně proběhlo čiření pomocí Carrezova činidla (po 10 ml obou roztoků). Vzorek byl protřepán a 5 minut ponechán v klidu. Následně byla baňka doplněna po rysku a roztok zfiltrován přes skládaný filtr. Z tohoto filtrátu byl odebrán 1 ml do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku směsí octanového pufru s ACN. U vzorků 12-13 byl navážen 1 g ke kterému bylo přidáno 40 ml redestilované vody. Připravený roztok byl ponechán 20 min v ultrazvuku. Celý objem byl převeden do 100 ml odměrné baňky a následně probíhalo Carrezovo čiření a ředění stejným způsobem jako u vzorků 9-10. Žvýkačka (vzorek 14) byla rozdrcena v třecí misce a převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml stejně jako 1 g vzorku pasty (vzorek 15). Roztoky byly ponechány 20 min v ultrazvukové lázni a poté centrifugovány při 10 000 otáčkách/min po dobu 15 min. Na závěr proběhlo jejich desetinasobné ředění směsí octanového pufru s ACN. Všechny vzorky byly ještě před analýzou HPLC/MS přefiltrovány přes stříkačkový PTFE filtr.

4.5 HPLC/MS podmínky

Chromatografická separace probíhala na kapalinovém chromatografu 1200 series (kapitola 4.1) s kolonou Raptor Polar o délce 100 mm, průměru 2,1 mm a velikosti povrchově porézních částic 2,7 μm za izokratických podmínek. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min a teplota kolony 30 °C. Detekce byla realizována pomocí MS. Dávkovaný objem byl 2 μl . Mrtvý objem kolony byl změřen pomocí acenaftenu na kapalinovém chromatografu LC-20AD prominence (kapitola 4.1) s detektorem diodového pole SPD-M30A za stejných podmínek a činil 0,49 min.

MS parametry

Optimalizace přechodů pro MRM mód byla provedena pomocí přímé infuze standardů umělých sladidel ve směsi ACN-mravenčan amonný (1:1) do hmotnostního spektrometru při snímání kladných i záporných iontů s ionizací elektrosprejem. Z důvodu velmi nízké ionizační účinnosti v režimu MRM při použití mravenčanového pufru byl pro optimalizaci separace dále

využíván režim SIM při snímání záporných iontů. Poměry m/z a deklastrační potenciály jednotlivých sladidel jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Podmínky měření na kapalinovém chromatografu s MS detekcí – režim SIM

Umělé sladidlo	Q1 mass [m/z]	Deklastrační potenciál [V]
Acesulfam	161,7	-40
Aspartam	292,8	-55
Cyklamát	177,8	-50
Sacharin	181,8	-10
Sukralóza	394,7	-85

Po optimalizaci metody byla ještě jednou provedena přímá infuze umělých sladidel. Tentokrát ve směsi ACN-octan amonný (1:1). Při použití octanového pufru byla již ionizační účinnost při MRM větší, a proto byla využita pro kvantitativní analýzu sladidel v reálných vzorcích. Parametry pro měření v režimu MRM při snímání záporných iontů (kvantifikační ionty snímány 50 ms, konformační 10 ms) včetně deklastračních potenciálů (DP), kolizní energie (CE) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP) jsou uvedeny v tabulce 8. Ostatní MS parametry byly následující – průtoky plynů podílejících se na rozprášení a sušení eluátu: „curtain gas“ – 20 psi, „ion source gas 1“ – 40 psi, „ion source gas 2“ – 50 psi, kolizní plyn: „collision gas“ – medium, teplota 300 °C, „ion spray voltage“ -4500 V, vstupní potenciál -10V.

Tabulka 8: Podmínky měření na kapalinovém chromatografu s MS detekcí - režim MRM

Umělé sladidlo	MRM přechod		DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Acesulfam K	161,8/81,9	kvantifikační	-40	-20	-5
	161,8/77,9	konformační	-40	-44	-7
Aspartam	292,9/260,9	kvantifikační	-70	-16	-9
	292,9/199,9	konformační	-70	-20	-7
Cyklamát	177,9/79,9	kvantifikační	-25	-46	-7
	177,9/90,9	konformační	-25	-12	-5
Sacharin	181,8/105,9	kvantifikační	-70	-26	-7
	181,8/154,9	konformační	-70	-14	-9
Sukralóza	394,8/358,9	kvantifikační	-85	-18	-11
	396,9/360,6	konformační	-85	-18	-9

4.6 Vyhodnocení dat

HPLC/MS data byla vyhodnocována pomocí programu Analyst (AB Sciex, USA). Experimentálně naměřená data byla v programu QC expert 2.9. (Trilobyte, Česko) proložena lineární regresí pro ASP a CYC. ACE a SAC byly proloženy polynomem druhého stupně. Pomocí grafických diagnostických testů (Williamsův, Pregibonův a L-R graf) byly detekovány a odstraněny odlehlé body kalibrační křivky a pro lineární závislosti byly zaznamenány směrodatné odchylky úseku a směrnice. Dále byla posouzena významnost absolutních členů.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Retenční chování umělých sladidel

Retenční chování sladidel bylo testováno na koloně Raptor Polar X s hybridní stacionární fází kombinující HILIC a iontově-výměnný mechanismus separace. V rámci diplomové práce byla studována změna retence v závislosti na změně koncentrace ACN v mobilní fázi, na změně pH a koncentrace pufru.

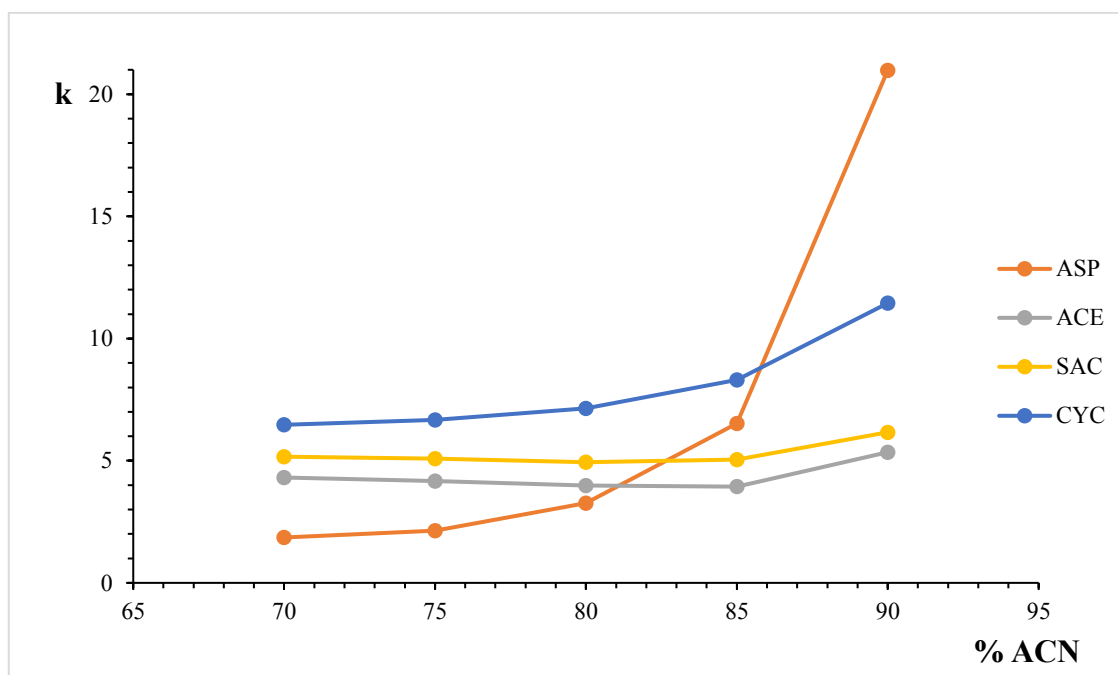
Retence SUC se výrazně neměnila v rámci celého měření diplomové práce, což není v souladu s publikovanými daty. Pravděpodobně jsou nepřesnosti v měření u tohoto standardu způsobeny jeho špatnou kvalitou. Standard SUC je zpravidla bílá krystalická látka, ale dostupný standard měl při přípravě standardních roztoků hnědou barvu a dosti zapáchal, pravděpodobně vlivem unikající HCl. Domníváme se, že došlo k rozkladu a daná chemikálie již obsahovala pouze stopy SUC. Z důvodu velké nepřesnosti vlivem špatné kvality standardu nebudou výsledky u tohoto sladidla diskutovány.

5.1.1 Vliv obsahu ACN v mobilní fázi

Vliv koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi na retenční chování jednotlivých umělých sladidel byl testován u mobilních fází obsahujících octan nebo mravenčan amonný ($c = 10 \text{ mmol/l}$) při hodnotách pH 3, 4 a 5. Celkem byly proměřeny retenční charakteristiky při pěti koncentracích ACN v rozmezí 70-90 %. Vypočtené retenční faktory všech studovaných sladidel jsou uvedeny v tabulkách P1 a P2 jako průměrné hodnoty ze tří opakovaných měření.

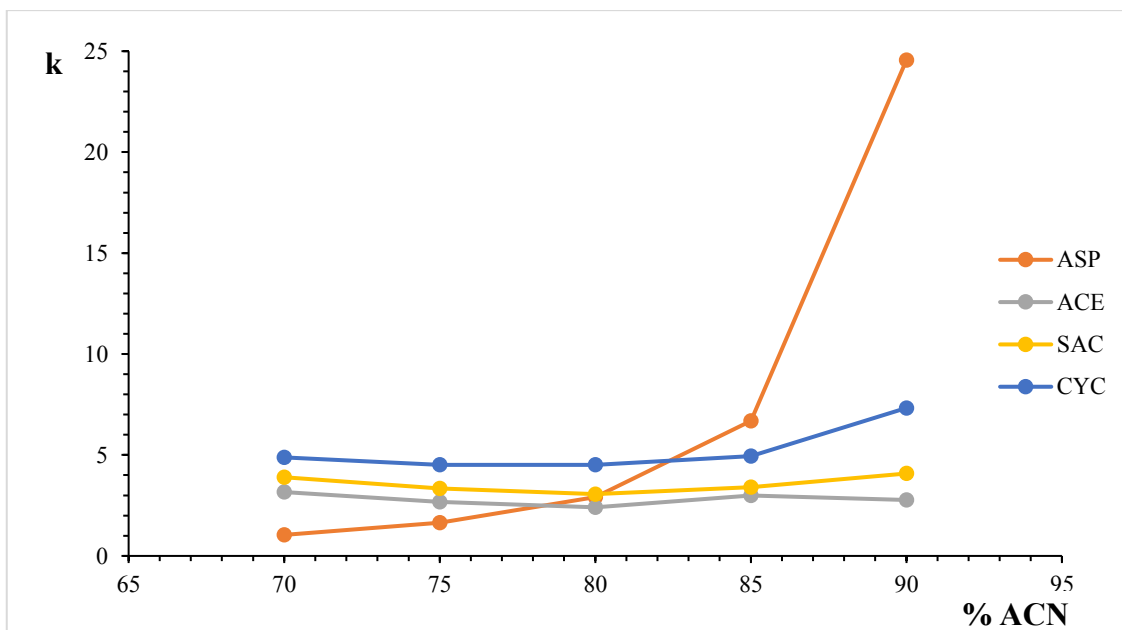
Při použití mravenčanu amonného (pH = 5) byl s rostoucí koncentrací ACN pozorován nárůst retence ASP a CYC (obrázek 14 a P 1-2). Pokud je obsah ACN v MF 80 % a vyšší, tak u ASP dochází k významnému nárůstu retence (obrázek 14 a P 1-2), avšak za současného rozmývání jeho píku. U ostatních studovaných sladidel dochází se stoupající koncentrací ACN k zúžení píků a tedy ke zvýšení odezvy detektoru. V případě ACE a SAC se retenční časy se stoupající koncentrací ACN pozvolna snižují a k mírnému nárůstu dochází až při koncentraci 90 % ACN v MF (obrázek 14), což může být způsobeno změnou separačního mechanismu u námi použité kolony. Při použití vyššího procenta acetonitrilu v mobilní fázi se na koloně Raptor Polar X vytvoří vodní vrstva na povrchu částic oxidu křemičitého. Polární analyty přejdou z acetonitrilové vrstvy do vodní, kde reagují s povrchem oxidu křemičitého a stacionární fází. Převládajícím mechanismem separace se stává HILIC a polární látky jsou zadrženy hydrofilními interakcemi se stacionární fází a eluují se déle. S narůstajícím procentem vody v mobilní fázi se uplatňuje mechanismus iontové výměny. Při změně pH ke kyseljším

hodnotám nárůst retence ACE a SAC u 90 % ACN slábne (obrázek P1) a u pH = 3 k němu vůbec nedochází (obrázek P2).



Obrázek 14: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující HCOONH_4 ($c = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=5$)

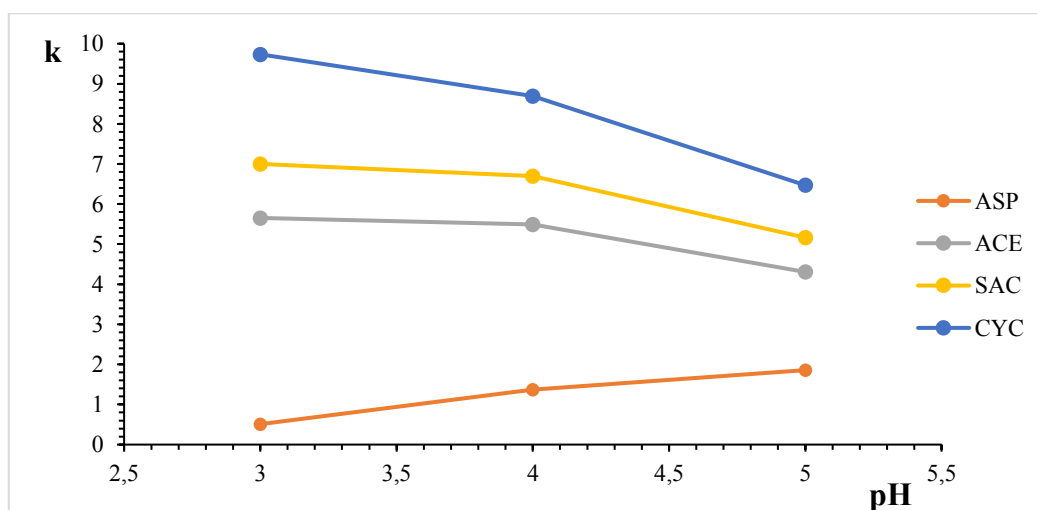
Retenční chování umělých sladidel je při použití octanu amonného podobné jako při použití mravenčanu amonného, avšak vlivem změny použitého pufru došlo ke snížení doby analýzy. Pouze v případě 90 % ACN bylo pozorováno rapidnější zvýšení retence u ASP (obrázek 15). Trend však zůstává stejný, ASP s rostoucí koncentrací ACN v mobilní fázi zvyšuje svojí retenci, CYC nejprve retenci oproti mravenčanu výrazně nemění a poté lehce stoupá až u 90 % ACN (obrázek 15). Stejně tak se nemění princip ani u ACE a SAC, u nichž se retenční časy se stoupající koncentrací ACN snižují a až při obsahu 90 % ACN v mobilní fázi mírně rostou (obrázek 15), a to i v kyselějším pH oproti mravenčanu (obrázek P 3-4). Výhodou použití octanového pufru byla také mnohem lepší ionizační účinnost a zlepšení symetrie pík u všech studovaných sladidel.



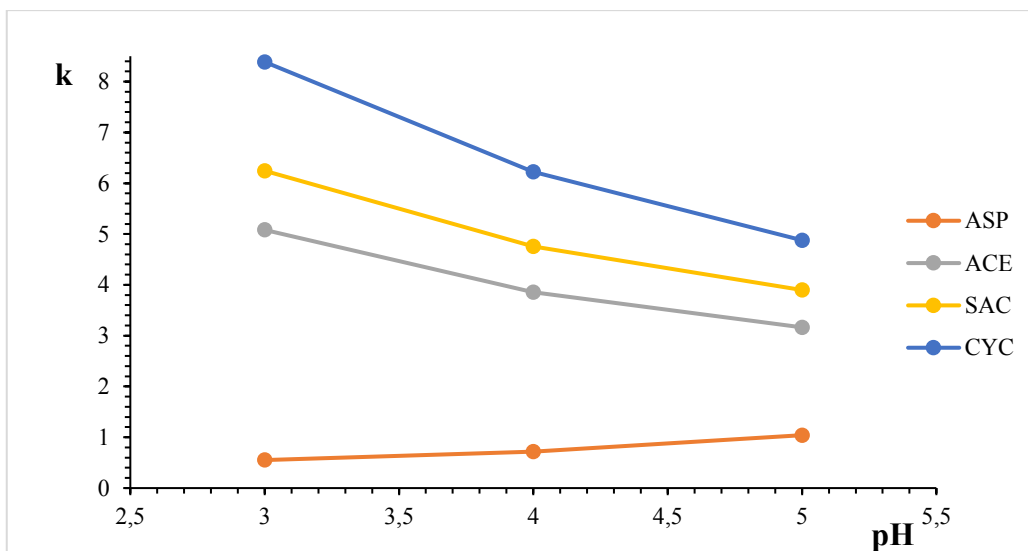
Obrázek 15: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=5$)

5.1.2 Vliv pH pufru

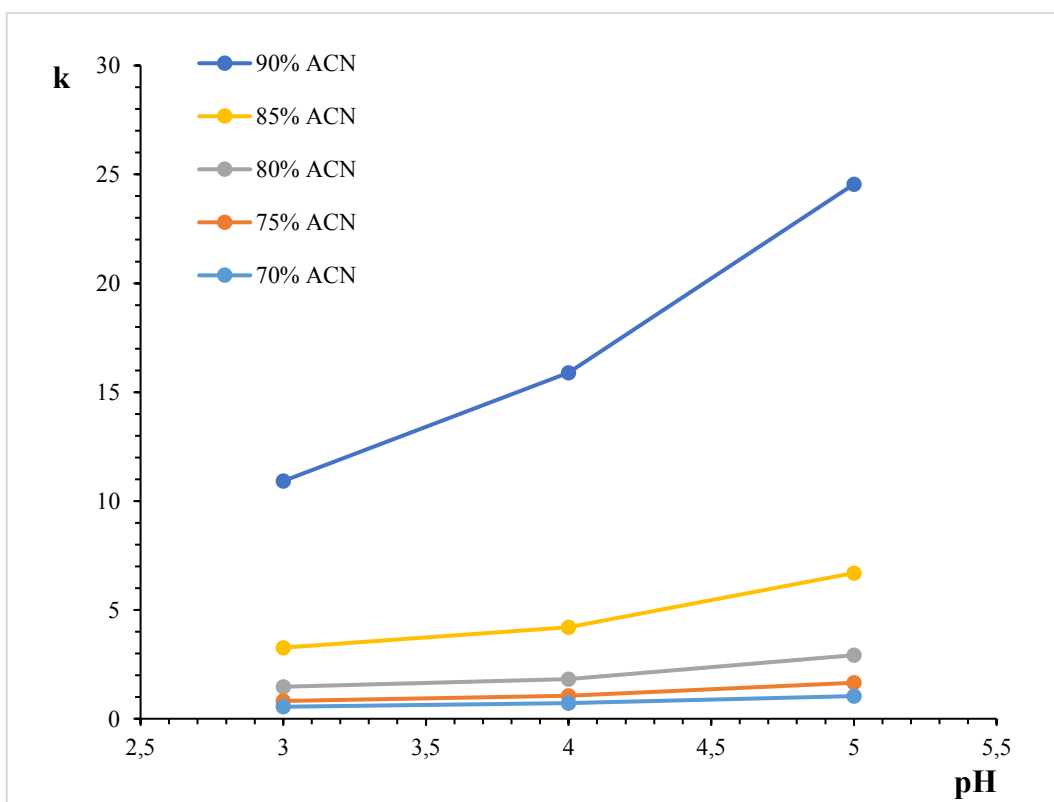
Vliv změny pH na retenci umělých sladidel byl zkoumán v mobilní fázi složené z octanu nebo mravenčanu amonného ($c = 10 \text{ mmol/l}$) a ACN s obsahem 70-90 %. Retenční chování bylo testováno u hodnot pH 3, 4 a 5. Při použití obou pufrů došlo ke stejným výsledkům. Málo ionizovatelný ASP snižuje svoji retenci se snižujícím se pH a u silně ionizujících molekul (ACE, SAC a CYC) bylo pozorováno zvýšení retence s klesajícím pH (obrázky 16-17 a P 5-8). U mobilních fází s vysokým obsahem ACN byl pokles v retenci ASP s klesajícím pH mnohonásobně vyšší než u mobilních fází s menším obsahem ACN (obrázek 18). ASP je dipeptid (kys. asparagové a fenylalaninu), který je stabilní při pH 4,3 a posunem ke kyselějšímu pH dochází k jeho hydrolyze. Vyšší retence ASP při pH = 5 je pravděpodobně způsobena slabými elektrostatickými interakcemi mezi negativně nabitým oxidem křemičitým a amfoterním ASP (dipeptid). Při nižších hodnotách pH má ASP kladný náboj, oxid křemičitý je neutrální a převládajícím mechanismem je rozdělení do vodné vrstvy. Proto je retenční chování ASP silně závislé na pH. U ionizujících molekul (ACE, SAC a CYC) docházelo k menší změně retence vlivem pH i koncentrace ACN (obrázky P 3-8). Sulfamáty (ACE, SAC a CYC) jsou záporně nabitě při všech studovaných hodnotách pH a mechanismus rozdělení do vodné vrstvy je zde patrně kombinován s elektrostatickou repulzí ze záporně nabitě stacionární fáze, která snižuje jejich retenci zejména u pH 5. Z naměřených výsledků sulfamátů můžeme pozorovat větší vliv hodnoty pH a koncentrace ACN v mobilní fázi na CYC (sulfonová kyselina), než na ACE a SAC (N-sulfonylamidy).



Obrázek 16: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l HCOONH₄ a ACN s obsahem 70%



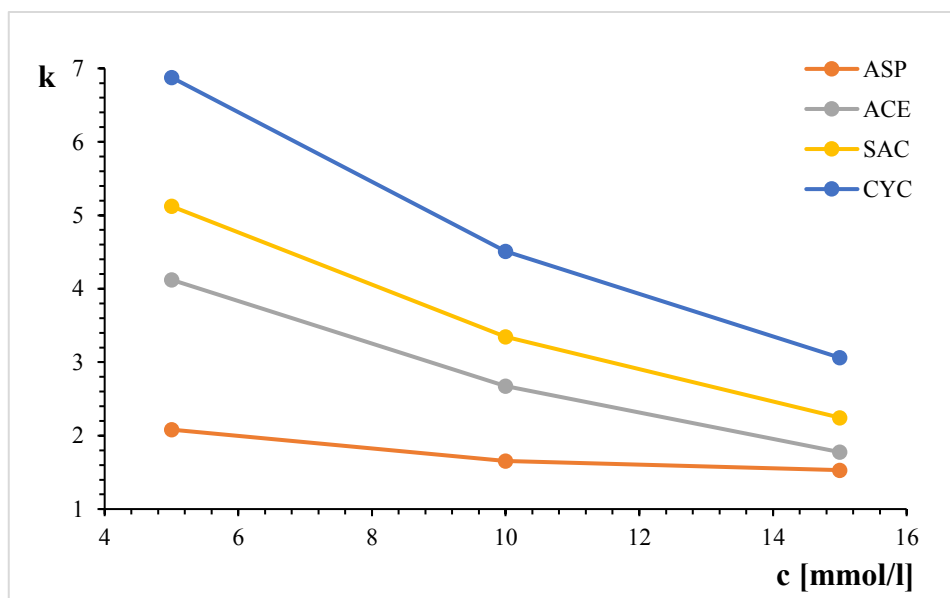
Obrázek 17: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a ACN s obsahem 70%



Obrázek 18: Závislost retenčního faktoru aspartamu na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l AcNH_4 a ACN s obsahem 70-90%

5.1.3 Vliv koncentrace pufru

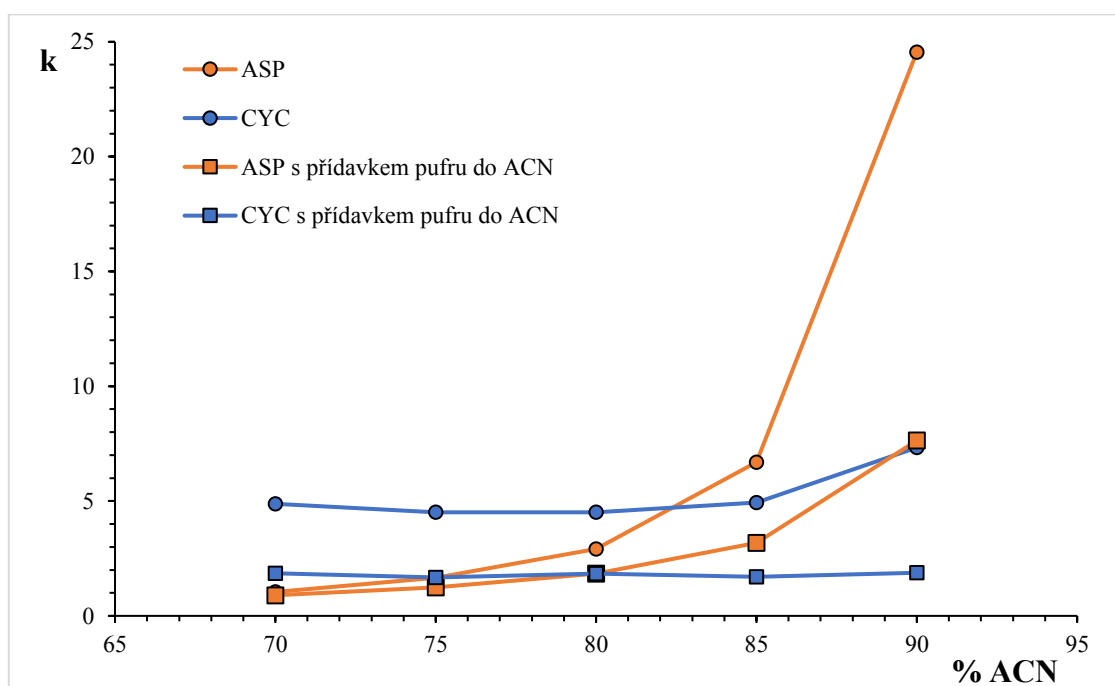
Pro monitorování vlivu koncentrace pufru byl vybrán pouze octan amonný, protože při jeho použití byly pozorovány užší a symetrické píky, citlivost hmotnostně spektrometrické detekce byla také mnohonásobně vyšší, a navíc se zkrátila doba analýzy. Retenční chování sladidel bylo testováno u tří koncentrací octanu amonného a to 5, 10 a 15 mmol/l o pH 5 s obsahem ACN v mobilní fázi mezi 70-90 %. Vypočtené retenční faktory jednotlivých sladidel jsou uvedeny v tabulce P3. Retence všech monitorovaných sladidel se zmenšuje se stoupající koncentrací pufru, a tedy větší iontovou silou mobilní fáze (obrázek 20 a obrázky P 9-12). Zvyšováním obsahu ACN v mobilní fázi se dominantním mechanismem separace stává HILIC (kapitola 5.1.1). Přidáním amonné soli do mobilní fáze s vysokým procentem ACN nejspíše dochází k omezení elektrostatické repulze sulfamátů, jelikož kation NH_4^+ je schopen kompenzovat negativní náboj stacionární fáze. Nicméně klesající trend retence všech studovaných sladidel se zvyšující koncentrací pufru zůstává stejný i při obsahu 90 % ACN (obrázek P 12).



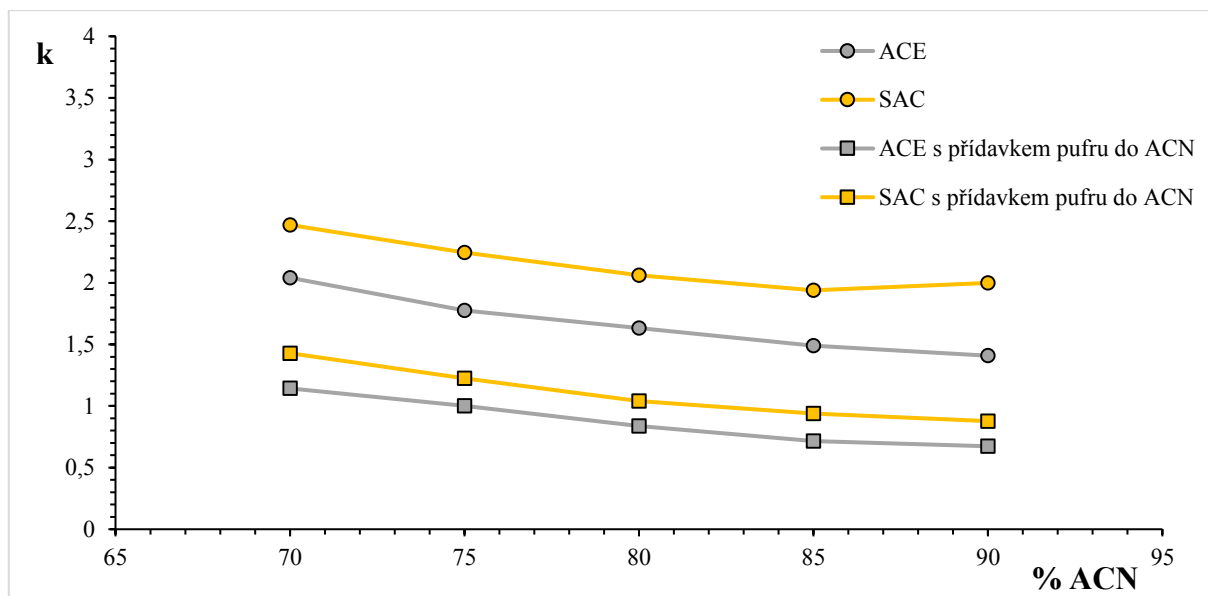
Obrázek 19: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 75% ACN

V neposlední řadě byl testován vliv přídavku soli také do organické složky mobilní fáze (acetonitrilu). Přídavkem $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ do ACN se zvýší koncentrace soli v mobilní fázi, a tedy její iontová síla. Vypočtené retenční faktory umělých sladidel u mobilních fází s přídavkem pufru do ACN jsou uvedeny v tabulce P4. Díky dalšímu navýšení koncentrace soli dojde k ještě většímu snížení retenčních časů všech umělých sladidel a čas analýzy se zkracuje

zhruba na polovinu, než před jeho přidavkem (obrázek 21 a 22). Aby bylo možné rozpustit octan v ACN, tak je nutné přidat malý podíl vody (kapitola 4.4.1). Tím dojde k malému zvýšení podílu vodné složky v MF. Při změně koncentrace ACN v mobilní fázi však zůstává koncentrace soli konstantní na rozdíl od předchozího případu, kdy sůl do ACN přidána nebyla. Na obrázku 21 je zobrazena závislost retenčního faktoru ASP a CYC na koncentraci ACN u mobilních fází s přidavkem a bez přidavku soli do organické složky mobilní fáze. Z obrázku je patrné, že při pouhé změně koncentrace ACN, za konstantní koncentrace soli nedochází k tak rapidní změně retence u 90 % ACN jako při současné změně koncentrace soli a koncentrace ACN. Z toho vyplývá, že koncentrace soli do značné míry ovlivňuje retenci ASP a CYC zvláště u mobilních fází s vysokým obsahem ACN. U sladidel ACE a SAC dochází vlivem přidavku soli do ACN pouze ke snížení retence u všech testovaných koncentrací ACN v mobilní fázi bez větších výchylek (obrázek 22). Z toho vyplývá, že u HILIC chromatografie je nutné optimalizovat složení mobilní fáze včetně veškerých aditiv, která do značné míry ovlivňují kvalitu separace.



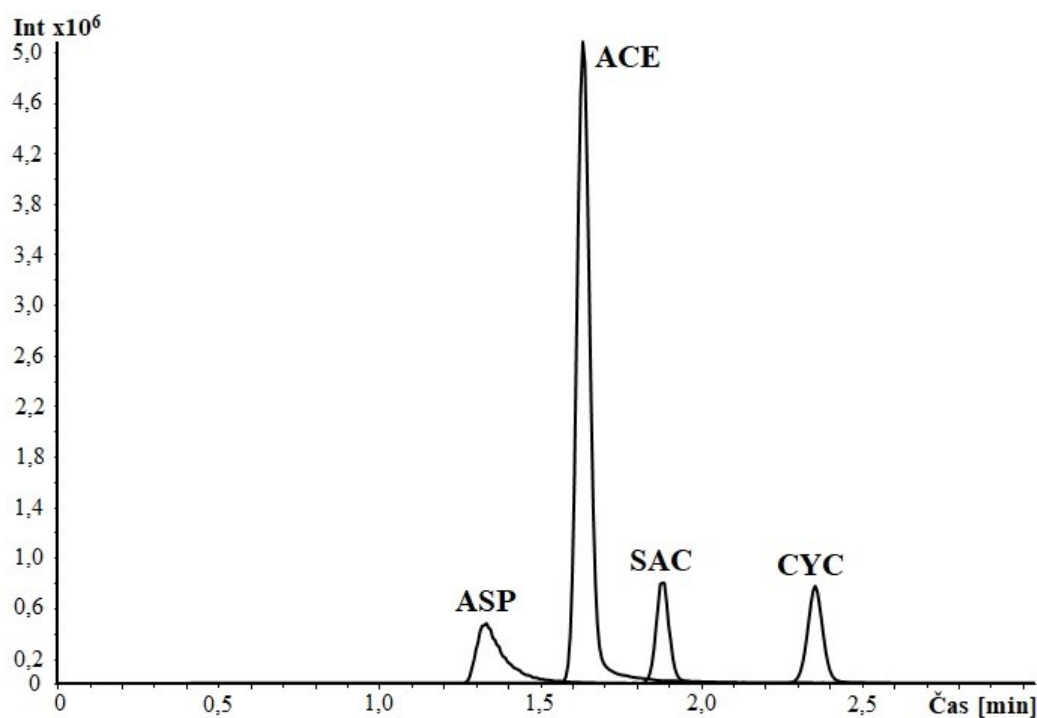
Obrázek 20: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN s přidavkem a bez přidavku pufru v mobilní fázi obsahující $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=5$)



Obrázek 21: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN s přidavkem a bez přidavku pufru v mobilní fázi obsahující $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 15 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=5$)

5.2 Analýza umělých sladidel ve vzorcích potravin

Ke zjištění přítomnosti a obsahu vybraných umělých sladidel ve vybraných vzorcích potravin a drogistických vzorcích byla použita optimalizovaná metoda s kolonou Raptor Polar. Jako mobilní fáze byl použit 75 % ACN v 10 mM octanu amonném o pH = 5, kde všechna studovaná sladidla byla eluována za 3 minuty. Pro separaci byla použita MS detekce v režimu MRM, jejíž podmínky jsou uvedeny v kapitole 4.5 a chromatogram znázorněn na obrázku 23.



Obrázek 22: Separace standardů umělých sladidel za optimalizovaných podmínek

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

5.2.1 Kalibrační měření

Nejprve byl připraven zásobní roztok standardů ASP, ACE, SAC a CYC o koncentraci 0,1 mg/l. Kvůli špatnému stavu standardu sukralózy toto sladidlo nebylo kvantifikováno v analyzovaných vzorcích. Ze zásobního roztoku standardů byla připravena kalibrační řada v rozsahu koncentrací 0,001 – 2,5 µg/ml a v závislosti na intenzitě signálu byla sestrojena kalibrační závislost v rozsahu koncentrací uvedených pro jednotlivé standardy v tabulce 10. Analýza každého kalibračního roztoku byla provedena třikrát a kalibrační data byla vyhodnocena v programu QC Expert, kde byly pomocí grafických diagnostických testů odstraněny odlehlé body, zaznamenány směrodatné odchylky a posouzena významnost absolutních členů (kapitola 4.6). Jednotlivé kalibrační závislosti spolu se směrodatnými odchylkami (SD) jednotlivých koeficientů jsou uvedeny v tabulce 9. V tabulce 10 jsou dále uvedeny koncentrační rozsahy kalibračních křivek, koeficienty determinace, přístrojové meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ), které byly stanoveny na základě poměru signálu ku šumu (S/N), mez detekce jako trojnásobek poměru S/N a mez kvantifikace jako desetinásobek poměru S/N. V případě ACE a SAC byly kalibrační křivky v daném koncentračním rozmezí nelineární a museli být aproximovány polynomem druhého stupně, stejně jako ve studii [93].

Tabulka 9: Křivková rovnice, významnost absolutního členu a směrodatná odchylka jednotlivých koeficientů

Analyt	Rovnice	Významnost absolutního členu	SD _a	SD _b	SD _c
ASP	$y = 3\,480\,322\,x + 64\,036$	významný	-	7453	7593
ACE	$y = -737\,606\,x^2 + 2\,519\,482x$	nevýznamný	28135	29596	-
SAC	$y = -331\,952\,x^2 + 2\,590\,084x + 32\,981$	významný	18109	40154	14421
CYC	$y = 3\,287\,250\,x$	nevýznamný	-	9159	-

SD_a – směrodatná odchylka koeficientu a (kvadratický člen)

SD_b – směrodatná odchylka koeficientu b (lineární člen)

SD_c – směrodatná odchylka koeficientu c (absolutní člen)

Tabulka 10: Koncentrační rozsah, koeficienty determinace, LOD a LOQ

Analyt	c [µg/ml]	R ²	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
ASP	0,05 - 2	0,9995	0,62	1,98
ACE	0,001 - 1,2	0,9997	0,37	1,19
SAC	0,01 - 2,5	0,9994	0,60	2,00
CYC	0,01 - 1	0,9999	0,48	1,59

5.2.2 Kvantitativní stanovení umělých sladidel v reálných vzorcích

Všechny vzorky byly k měření připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.4.2. Z kalibračních závislostí a experimentálně naměřených ploch píků byly vypočteny koncentrace jednotlivých umělých sladidel ve vzorcích. Každý vzorek byl měřen třikrát a výsledné koncentrace byly zprůměrovány (tabulka 11 a 12). Koncentrace sladidel se na obalech potravin neuvádějí, neboť to nepožaduje legislativa, proto není možné zkontrolovat správný obsah jednotlivých sladidel, ale pouze jejich přítomnost. Chromatografické separace všech vzorků jsou uvedeny v příloze na obrázcích P 13-27.

Nejčastěji používaným sladidlem je ACE, který byl detekován ve všech studovaných vzorcích. Často se vyskytoval v kombinaci s ASP detekovaným v 8 vzorcích, méně populární jsou pak SAC (detekován v 5 vzorcích) a CYC (detekován pouze ve 3 vzorcích). Navzdory stejně nastaveným podmínkám pro detekci sukralózy v režimu MRM s publikovanou literaturou se jí nepodařilo detekovat v žádném z testovaných vzorků. Všechna analyzovaná sladidla byla pravdivě uvedena na etiketách devíti vzorků (Coca cola Zero, Pepsi max, Red Bull, Getorade, šumivý nápoj Bolero, protein Bodylab, jogurtový nápoj Skyr, Jogobella Light a žvýkačky Airwaves). U výrobků energetického nápoje Black horse a ústní vody Odol classic nebyla detekována sladidla deklarována výrobcem, a navíc zde byla kvantifikována jiná sladidla, která na obalu uvedena nebyla (tabulka 11). Vzorky šumivých tablet hořčiku, proteinu Myprotein a zubní pasty Odol cool fresh obsahovaly sladidlo (tabulka 12), které nebylo deklarováno výrobcem, v případě šumivých tablet byl však obsah velmi nízký, až pod mezí kvantifikace. Nejhůře dopadl vzorek ovocného lízátko bez cukru, kde byla detekována všechna analyzovaná sladidla, ale ani jedno nebylo uvedeno na obalu (tabulka 12).

Tabulka 11: Koncentrace umělých sladidel v kapalných vzorcích

Vzorek	Název vzorku	Sladidlo	Koncentrace [mg/l]	Směrodatná odchylka
1	limonáda Coca Cola Zero	ASP	75,93	0,64
		ACE	123,15	1,38
		CYC	198,99	3,52
2	limonáda Pepsi max	ASP	424,35	13,79
		ACE	33,74	1,66
3	energetický nápoj RedBull sugarfree	ASP	129,63	0,85
		ACE	160,63	4,32
4	iontový nápoj Getorade	ACE	10,61	0,68
5	energetický nápoj Black horse	ASP**	<LOD	-
		ACE	< LOQ	-
		SAC*	188,95	25,84
6	ústní voda Odol classic	ASP*	28,36	0,23
		ACE*	151,30	2,52
		SAC**	<LOD	

* Obsahuje sladidlo, které není deklarováno na obalu

** Neobsahuje sladidlo, které je uvedeno na obalu

Tabulka 12: Koncentrace umělých sladidel v pevných vzorcích

Vzorek	Název vzorku	Sladidlo	Koncentrace [µg/ml]	Směrodatná odchylka
7	šumivý nápoj Bolero raspberry	ACE	52238,67	2695,03
8	šumivé tablety Hořčík citron	ACE*	<LOQ	-
		SAC	380,33	11,80
		CYC	10392,40	95,81
9	protein Myprotein, rainbow candy	ACE	1356,11	65,19
		SAC*	464,69	114,62
10	protein Bodylab, salted caramel	ACE	2103,21	264,60
11	ovocné Lízátko bez cukru	ASP*	190,11	48,29
		ACE*	104,04	16,12
		SAC*	152,33	28,15
		CYC*	133,08	23,56
12	jogurtový nápoj Skyr	ASP	<LOQ	-
		ACE	3,95	0,17
13	jogurt Jogobella Light, jahoda	ASP	39,67	1,16
		ACE	48,39	0,54
14	žvýkačky Airwaves, mentol & eukalyptus	ASP	1146,05	12,22
		ACE	699,15	13,09
15	zubní pasta Odol cool fresh	ACE*	2,60	0,50
		SAC	1987,63	151,91

* Obsahuje sladidlo, které není deklarováno na obalu

5.3 Validace metody

5.3.1 Návratnost metody

V rámci validace byla testována návratnost na třech koncentračních hladinách v závislosti na koncentračním rozsahu kalibračních závislostí (viz. tabulka 10). Pro ASP a SAC byly vybrány koncentrace 1,8; 0,5 a 0,1 µg/ml, pro ACE a CYC koncentrace 0,5; 0,1 a 0,02 µg/ml. Všechny kalibrační roztoky byly připraveny 3x nezávisle na sobě a každý z nich 3x analyzován. Hodnoty návratností v tabulce 13 odpovídají průměru z devíti měření každého kalibračního roztoku. Dle validačních protokolů [155] by se hodnoty návratnosti měli pohybovat mezi 80-110 %, což bylo splněno ve všech případech (tabulka 13).

Tabulka 13: Návratnost metody

Sladidlo	Připravovaná koncentrace [µg/ml]	Naměřená koncentrace [µg/ml]	Návratnost [%]
ASP	1,80	1,9032	105,73
	0,50	0,5165	103,30
	0,10	0,0895	89,53
ACE	0,50	0,4657	93,13
	0,10	0,1037	103,68
	0,02	0,0220	109,75
SAC	1,80	1,7759	98,66
	0,50	0,4922	98,43
	0,10	0,0980	98,03
CYC	0,50	0,4767	95,34
	0,10	0,0963	96,29
	0,02	0,0199	99,65

5.3.2 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost shody mezi navzájem nezávisle naměřenými výsledky za podmínek, při kterých bylo opakované měření vzorků prováděno stejným pracovníkem, na stejném přístroji a za stejných pracovních podmínek během krátkého časového rozmezí. Pro testování opakovatelnosti byly vybrány vzorky limonády Pepsi max (vz. 2), šumivé tablety hořčíku (vz.8) a jogurtu Jogobella (vz. 13). Pro stanovení intradenní opakovatelnosti byly z každého vzorku potravin připraveny 1. den tři dílčí vzorky a 2. den pět dílčích vzorků. Každý z těchto dílčích vzorků byl 3x analyzován. Opakovatelnost je vyjádřena jako průměr relativní směrodatné odchylky (RSD) všech měření v rámci daného dne (tabulka 14). Mezigodenní opakovatelnost je vyjádřena jako průměr relativní směrodatné odchylky (RSD) všech měření (celkem 24 měření). Podle validačních protokolů [155] by hodnoty RSD neměly přesáhnout 11 %, což bylo splněno u všech vzorků bez ohledu na typ matrice nebo úpravu vzorku.

Tabulka 14: Intradenní a mezigodenní opakovatelnost

Vzorek	Analyt	intradenní opakovatelnost				mezigodenní opakovatelnost	
		1. den		2. den		koncentrace [mg/l]	RSD [%]
		koncentrace [mg/l]	RSD [%]	koncentrace [mg/l]	RSD [%]		
2	ASP	424,35	3,25	440,17	2,10	433,39	3,20
	ACE	33,74	4,91	37,19	4,50	35,71	6,68
		koncentrace [μg/g]	RSD [%]	koncentrace [μg/g]	RSD [%]	koncentrace [μg/g]	RSD [%]
8	SAC	380,33	3,10	329,95	6,76	342,54	8,68
	CYC	10392,40	0,92	11143,91	2,07	11018,66	3,20
13	ASP	39,67	2,93	44,32	4,72	42,99	6,55
	ACE	48,39	1,13	49,09	2,14	48,89	2,02

6 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá studiem retenčního chování různých typů sladidel na koloně Raptor Polar s dvojitým retenčním mechanismem a optimalizací HPLC/MS podmínek pro stanovení vybraných sladidel ve vzorcích potravin a drogistických výrobků. Retenční chování standardů sladidel ASP, ACE, CYC, SAC a SUC bylo zkoumáno v závislosti na změně koncentrace ACN v mobilní fázi, změně pH a koncentrace pufru. Optimální separace pro analýzu sladidel probíhala na koloně Raptor Polar za izokratických podmínek s mobilní fází skládající se z 10 mmol/l octanu amonného o pH 5 a 75 % ACN za 3 minuty. Optimalizovaná HPLC/MS metoda byla úspěšně použita pro analýzu sladidel v různých typech vzorků jako nápoje, šumivé nápoje a tablety, jogurty, proteiny, lízátka, žvýkačky a zubní pasty. Kvůli špatnému stavu standardu sukralózy se nepodařilo optimalizovat podmínky pro její stanovení a nebyla detekována ani v jednom vzorku. Z tohoto důvodu je optimalizovaná metoda vhodná pouze ke stanovení ASP, ACE, CYC a SAC. Devět vzorků mělo pravdivě uvedena umělá sladidla na svých obalech. U dalších šesti vzorků byl zjištěn rozdíl oproti informacím uvedeným na obalu a deklarovaným výrobcem. Jednotlivá umělá sladidla byla následně kvantifikována, nicméně není možné porovnat jejich obsah s údaji od výrobce, protože množství sladidel se na obalech dle legislativy uvádět nemusí.

7 Použitá literatura

- [1] BEMILLER, James N. *Carbohydrate chemistry for food scientists*. Third edition. Duxford: Elsevier/Woodhead Publishing, 2019. ISBN 978-0-12-812069-9.
- [2] ROUBÍK, Lukáš. *Moderní výživa ve fitness a silových sportech*. Praha: Erasport, 2018. ISBN 978-80-905685-5-6.
- [3] *Carbohydrates. Understanding Wine Chemistry*. Chichester, UK, 2016, 11-18. ISBN 9781118730720. DOI:10.1002/9781118730720.ch2.
- [4] SLIMÁKOVÁ, Margit. *Velmi osobní kniha o zdraví*. V Brně: BizBooks, 2018. ISBN 978-80-265-0753-6.
- [5] POUROVÁ, Veronika a Andrea JAKEŠOVÁ. *O výživě*. Praha: Pointa, 2019. ISBN 978-80-88335-68-9.
- [6] WALEK, Pavel a Josef TÓTH. *Co vám výživoví poradci neříkají? (Protože to nevědí)*. Praha: Fitness Innovations, 2015. ISBN 978-80-901714-0-4.
- [7] SKALICKÁ, Kristýna. *Neber to jídlo tak vážně, je to jen jídlo*. 2020. Dostupné z: <https://www.tojidlo.cz/ebook>.
- [8] SKALICKÁ, Kristýna. *Neber to jídlo tak vážně*. Brno: CPress, 2020. ISBN 978-80-264-3369-9.
- [9] LEVINOVITZ, Alan. *Lži a mýty o tom, co jíme: Výstraha: pravda o soli, cukru, tuku a především o lepku*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-5688-2.
- [10] SLIMÁKOVÁ, Margit. Sacharidy. *Margit.cz*. Dostupné z: <https://www.margit.cz/encyklopedie/sacharidy/>
- [11] MUL, Joram D., Kristin I. STANFORD, Michael F. HIRSHMAN a Laurie J. GOODYEAR. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. *Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise*. Elsevier, 2015, 17-37. ISBN: 9780128039915. DOI:10.1016/bs.pmbts.2015.07.020.
- [12] SLIMÁKOVÁ, Margit. Diabetes. *Margit.cz*. Dostupné z: <https://www.margit.cz/pomoc/diabetes/>.
- [13] SAPRA, Amit a Priyanka BHANDARI. *Diabetes Mellitus*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551501/>
- [14] SLIMÁKOVÁ, Margit. Glykemický index. *Margit.cz*. Dostupné z: <https://www.margit.cz/encyklopedie/glykemicky-index/>.
- [15] SADLER, Michele. FOOD, Glycaemic Response and Health. *International Life Sciences Institute*. 2011. Dostupné z: <http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/Glycaemic-Response-2011.pdf>.
- [16] GÁLIKOVÁ, Zuzana. Co je glykemický index a jak skutečně ovlivní naše hubnutí?. *Aktin*. 2018. Dostupné z: <https://aktin.cz/co-je-glykemicky-index-a-jak-skutecne-ovlivni-nase-hubnuti>.
- [17] Glykemický index a Glykemická nálož. *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/glykemicky-index-a-glykemicka-naloz.aspx>.
- [18] Fitness 007: *Glykemický index – Co znamená, co určuje a v čem mi pomůže?*. Dostupné z: <https://www.fitness007.cz/poradna/glykemicky-index-co-znamená-co-určuje-a-v-cem-mi-pomuze/>.

- [19] SUN, Lijuan, Dinesh Viren RANAWANA, Melvin Khee-Shing LEOW a Christiani Jeyakumar HENRY. Effect of chicken, fat and vegetable on glycaemia and insulinaemia to a white rice-based meal in healthy adults. *European Journal of Nutrition*. 2014, 53(8), 1719-1726. ISSN 1436-6207. DOI:10.1007/s00394-014-0678-z
- [20] BELL, Kirstine, Peter PETOCZ, Stephen COLAGIURI a Jennie BRAND-MILLER. Algorithms to Improve the Prediction of Postprandial Insulinaemia in Response to Common Foods. *Nutrients*. 2016, 8(4). ISSN 2072-6643. DOI:10.3390/nu8040210.
- [21] BAO, Jiansong, Vanessa DE JONG, Fiona ATKINSON, Peter PETOCZ a Jennie C. BRAND-MILLER. Food insulin index: physiologic basis for predicting insulin demand evoked by composite meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, 90(4), 986-992. ISSN 0002-9165. DOI:10.3945/ajcn.2009.27720.
- [22] ŠINDELÁŘ, Miloslav a Lukáš ROUBÍK. Jsou umělá sladidla nebezpečná?. *Institut moderní výživy*. Dostupné z: <https://www.institutmodernivyzy.cz/jsou-umela-sladidla-nebezpecna/>.
- [23] *NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008: o potravinářských přídatných látkách.*
- [24] CHATTOPADHYAY, Sanchari, Utpal RAYCHAUDHURI a Runu CHAKRABORTY. Artificial sweeteners – a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014, 51(4), 611-621. ISSN 0022-1155. DOI:10.1007/s13197-011-0571-1
- [25] ALSUNNI, Ahmed Abdulrahman. Effects of Artificial Sweetener Consumption on Glucose Homeostasis and Its Association with Type 2 Diabetes and Obesity. *International Journal of General Medicine*. 2020, 775-785. ISSN 1178-7074.
- [26] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0509-9.
- [27] GABROVSKÁ, Dana a Markéta CHÝLKOVÁ. *Sladká fakta o cukrech a sladidlech, aneb, Čím si osladit život*. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2017. ISBN 978-80-88019-17-6.
- [28] TURNER, Alexandria, Martin VEYSEY, Simon KEELY, Christopher J. SCARLETT, Mark LUCOCK a Emma L. BECKETT. Intense Sweeteners, Taste Receptors and the Gut Microbiome: A Metabolic Health Perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17(11). ISSN 1660-4601.
- [29] SUEZ, Jotham, Tal KOREM, Gili ZILBERMAN-SCHAPIRA, Eran SEGAL a Eran ELINAV. Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes*. 2015, 6(2), 149-155. ISSN 1949-0976.
- [30] LOHNER, Szimonetta, Ingrid TOEWS a Joerg J. MEERPOHL. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. *Nutrition Journal*. 2017, 16(1). ISSN 1475-2891. DOI:10.1186/s12937-017-0278-x.
- [31] SARAIVA, Ariana, Conrado CARRASCOSA, Dele RAHEEM, Fernando RAMOS a António RAPOSO. Natural Sweeteners: The Relevance of Food Naturalness for Consumers, Food Security Aspects, Sustainability and Health Impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17(17). ISSN 1660-4601. DOI:10.3390/ijerph17176285.
- [32] PANG, Michelle D., Gijs H. GOOSSENS a Ellen E. BLAAK. The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Frontiers in Nutrition*. 2021. ISSN 2296-861X. DOI:10.3389/fnut.2020.598340.
- [33] ÇIÇEK, Serhat Sezai. Structure-Dependent Activity of Plant-Derived Sweeteners. *Molecules*. 2020, 25(8). ISSN 1420-3049. DOI:10.3390/molecules25081946.

- [34] PEPINO, M. Yanina. *Metabolic effects of non-nutritive sweeteners*. 2015, 450-455. ISSN 00319384. DOI:10.1016/j.physbeh.2015.06.024
- [35] WEIHRAUCH, M.R. a V. DIEHL. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology*. 2004, 15(10), 1460-1465. ISSN 09237534.
- [36] LISTÍK, Petr. *NÁPOJE ZE SUPERMARKETŮ BILLA, TESCO, KAUF LAND A DALŠÍ*.
- [37] ČÁPOVÁ, Barbora. *Energetické nápoje a jejich přírodní alternativy*. Pardubice, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.
- [38] *NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1333/2008: o potravinářských přídatných látkách*.
- [39] MOSDØL, Annhild, Gunn Elisabeth VIST, Camilla SVENDSEN, Hubert DIRVEN, Inger Therese Laugsand LILLEGAARD, Gro Haarklou MATHISEN, Trine HUSØY a C. Mary SCHOOLING. Hypotheses and evidence related to intense sweeteners and effects on appetite and body weight changes: A scoping review of reviews. *PLoS ONE*. 2018, 13(7). ISSN 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0199558.
- [40] ŠINDELÁŘ, Miloslav a Lukáš ROUBÍK. JSOU UMĚLÁ SLADIDLA NEBEZPEČNĚJŠÍ NEŽ CUKR?. *Institut moderní výživy*. Dostupné z: <https://www.institutmodernivyzyvy.cz/umela-sladila/>.
- [41] SUEZ, Jotham, Tal KOREM, David ZEEVI et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014, 514(7521). ISSN 0028-0836.
- [42] UMĚLÁ SLADIDLA ZVYŠUJÍ INZULÍN?. *Institut moderní výživy*. Dostupné z: <https://www.institutmodernivyzyvy.cz/umela-sladidla-zvysuji-inzulin/>.
- [43] PALMNÄS, Marie S. A., Theresa E. COWAN, Marc R. BOMHOF et al. Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *PLoS ONE*. 2014, 9(10). ISSN 1932-6203.
- [44] GÜLTEKIN, Fatih. Food Additives And Microbiota. *Northern Clinics of Istanbul*. 2019. ISSN 21484902. DOI:10.14744/nci.2019.92499.
- [45] WANG, Qiao-Ping, Duncan BROWMAN, Herbert HERZOG, G. Gregory NEELY a Marie-Joelle VIROLLE. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLOS ONE*. 2018, 13(7). ISSN 1932-6203.
- [46] SPENCER, Marisa, Amit GUPTA, Lauren Van DAM, Carol SHANNON, Stacy MENEES a William D CHEY. Artificial Sweeteners: A Systematic Review and Primer for Gastroenterologists. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2016, 22(2), 168-180. ISSN 2093-0879. DOI:10.5056/jnm15206.
- [47] DREWNOWSKI, A. a C. D. REHM. The use of low-calorie sweeteners is associated with self-reported prior intent to lose weight in a representative sample of US adults. *Nutr & Diabetes*. 2016, 6(3), 202-202. ISSN 2044-4052. DOI:10.1038/nutd.2016.9.
- [48] LOBACH, Alexandra R., Ashley ROBERTS a Ian R. ROWLAND. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, 385-399. ISSN 02786915. DOI:10.1016/j.fct.2018.12.005.
- [49] MOORADIAN, Arshag D., Meridith SMITH a Masaaki TOKUDA. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2017, 1-8. ISSN 24054577.
- [50] MARTYN, Danika, Maryse DARCH, Ashley ROBERTS, Han LEE, Tina YAQIONG TIAN, Naoko KABURAGI a Pablo BELMAR. Low-/No-Calorie Sweeteners: A Review of Global Intakes. *Nutrients*. 2018, 10(3). ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu10030357.

- [51] AZAD, Meghan B., Ahmed M. ABOU-SETTA, Bhupendrasinh F. CHAUHAN et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Canadian Medical Association Journal*. 2017, 189(28), 929-939. ISSN 0820-3946.
- [52] BROWN, R. J., M. WALTER a K. I. ROTHER. Effects of Diet Soda on Gut Hormones in Youths With Diabetes. *Diabetes Care*. 2012, 35(5), 959-964. ISSN 0149-5992.
- [53] ANTON, Stephen D., Corby K. MARTIN, Hongmei HAN, Sandra COULON, William T. CEFALU, Paula GEISELMAN a Donald A. WILLIAMSON. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010, 55(1), 37-43. DOI: 10.1016/j.appet.2010.03.009.
- [54] PEPINO, M. Yanina, Courtney D. TIEMANN, Bruce W. PATTERSON, Burton M. WICE a Samuel KLEIN. Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care*. 2013, 36(9), 2530-2535. ISSN 0149-5992.
- [55] TEMIZKAN, S, O DEYNELI, M YASAR et al. Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2015, 69(2), 162-166. ISSN 0954-3007. DOI:10.1038/ejcn.2014.208.
- [56] GREENWOOD, D. C., D. E. THREAPLETON, C. E. L. EVANS, C. L. CLEGHORN, C. NYKJAER, C. WOODHEAD a V. J. BURLEY. Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose–response meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Nutrition*. 2014, 112(5), 725-734. ISSN 0007-1145. DOI:10.1017/S0007114514001329.
- [57] FAGHERAZZI, Guy, Alice VILIER, Daniela SAES SARTORELLI, Martin LAJOUS, Beverley BALKAU a Françoise CLAVEL-CHAPELON. Consumption of artificially and sugar-sweetened beverages and incident type 2 diabetes in the Etude Epidémiologique auprès des femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale–European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, 97(3), 517-523. ISSN 0002-9165.
- [58] Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC-InterAct. *Diabetologia*. 2013, 56(7), 1520-1530. ISSN 0012-186X.
- [59] FAGHERAZZI, Guy, Gaëlle GUSTO, Aurélie AFFRET et al. Chronic Consumption of Artificial Sweetener in Packets or Tablets and Type 2 Diabetes Risk: Evidence from the E3N-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2017, 70(1), 51-58. ISSN 0250-6807.
- [60] O'CONNOR, Laura, Fumiaki IMAMURA, Marleen A. H. LENTJES, Kay-Tee KHAW, Nicholas J. WAREHAM a Nita G. FOROUHI. Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia*. 2015, 58(7), 1474-1483. ISSN 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-015-3572-1.
- [61] QIN, Pei, Quanman LI, Yang ZHAO et al. Sugar and artificially sweetened beverages and risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and all-cause mortality: a dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Epidemiology*. 2020, 35(7), 655-671. ISSN 0393-2990.
- [62] DE KONING, Lawrence, Vasanti S MALIK, Eric B RIMM, Walter C WILLETT a Frank B HU. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011, 93(6), 1321-1327. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.110.007922.

- [63] FOWLER, Sharon P.G., Ken WILLIAMS a Helen P. HAZUDA. Diet Soda Intake Is Associated with Long-Term Increases in Waist Circumference in a Biethnic Cohort of Older Adults: The San Antonio Longitudinal Study of Aging. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2015, 63(4), 708-715. ISSN 00028614. DOI: 10.1111/jgs.13376.
- [64] PEPINO, M. Yanina. *Metabolic effects of non-nutritive sweeteners*. 2015, 450-455. ISSN 00319384. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.06.024.
- [65] TATE, Deborah F, Gabrielle TURNER-MCGRIEVY, Elizabeth LYONS et al. Replacing caloric beverages with water or diet beverages for weight loss in adults: main results of the Choose Healthy Options Consciously Everyday (CHOICE) randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012, 95(3), 555-563. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.111.026278.
- [66] MAERSK, Maria, Anita BELZA, Hans STØDKILDE-JØRGENSEN et al. Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle, and visceral fat depot: randomized intervention study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012, 95(2), 283-289. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.111.022533.
- [67] PETERS, John C., Holly R. WYATT, Gary D. FOSTER et al. The effects of water and non-nutritive sweetened beverages on weight loss during a 12-week weight loss treatment program. *Obesity*. 2014, 22(6), 1415-1421. ISSN 1930-7381.
- [68] BERNARDO, WM, RS SIMÕES, RF BUZZINI, VM NUNES a FPA GLINA. Adverse effects of the consumption of artificial sweeteners - systematic review. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2016, 62(2), 120-122. ISSN 0104-4230.
- [69] PEPIN, Alexandra a Pascal IMBEAULT. Les édulcorants de la controverse. *Médecine/sciences*. 2020, 36(5), 472-478. ISSN 0767-0974.
- [70] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [71] KRUTOŠÍKOVÁ, Alžbeta a Michal UHER. *Natural and synthetic sweet substances*. New York: Ellis Horwood, 1992. ISBN 80-224-0244-3.
- [72] O'DONNELL, Kay a Malcolm KEARSLEY. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 978-0-470-65968-7.
- [73] MOORADIAN, Arshag D., Meridith SMITH a Masaaki TOKUDA. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2017, 18, 1-8. ISSN 24054577.
- [74] SHANKAR, Padmini, Suman AHUJA a Krishnan SRIRAM. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*. 2013, 29(11-12), 1293-1299. ISSN 08999007.
- [75] ČOPÍKOVÁ, Jana, Jitka MORAVCOVÁ, Zdeněk WIMMER, Lubomír OPLETAL, Oldřich LAPČÍK a Pavel DRAŠAR. Náhradní sladidla. *Chemické listy*. 2013, 867-874. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_11_867-874.pdf.
- [76] BUTCHKO, Harriett H., W.Wayne STARGEL, C.Phil COMER et al. Aspartame: Review of Safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2002, 35(2), 1-93. ISSN 02732300. DOI: 10.1006/rtp.2002.1542.
- [77] JAK NAŠE TĚLO ZPRACOVÁVÁ UMĚLÉ SLADIDLO ASPARTAM. *Institut moderní výživy*. Dostupné z: <https://www.institutmodernivyzy.cz/aspartam/>.
- [78] SPENCER, Marisa, Amit GUPTA, Lauren Van DAM, Carol SHANNON, Stacy MENEES a William D CHEY. Artificial Sweeteners: A Systematic Review and Primer for Gastroenterologists. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2016, 22(2), 168-180. ISSN 2093-0879. DOI: 10.5056/jnm15206.

- [79] Neotame as a sweetener and flavour enhancer - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA Journal*. 2007, 5(11). ISSN 18314732. DOI: 10.2903/j.efsa.2007.581.
- [80] Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal*. 2010, 8(4). ISSN 18314732. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1537.
- [81] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-2084-8.
- [82] Thaumatin. *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92140.aspx>.
- [83] E 957 - Thaumatin. *Fér potravina*. Dostupné z: <https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E957>.
- [84] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Statut GRAS pro sladidlo z Luo Han Guo. *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/statut-gras-pro-sladidlo-z-luo-han-guo.aspx>.
- [85] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 497/2014: kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 a příloha nařízení Komise (EU) č. 231/2012, pokud jde o použití advantamu jako sladidla. Brusel, 2014. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32014R0497&from=NL>.
- [86] Alitam. *Informační centrum bezpečnosti potravin*. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92109.aspx>.
- [87] SLIMÁKOVÁ, Margit. Cukr a jeho „zdravé alternativy“. *Margit.cz*. Dostupné z: <https://www.margit.cz/cukr-a-zdrave-alternativy/>.
- [88] SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 94/35/ES: o náhradních sladidlech pro použití v potravinách. 1994. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1994L0035:20060815:CS:PDF>.
- [89] SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 96/83/ES: kterou se mění směrnice 94/35/ES o náhradních sladidlech pro použití v potravinách. 1996. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=31996L0083>.
- [90] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/115/ES: kterou se mění směrnice 94/35/ES o náhradních sladidlech pro použití v potravinách. 2003. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32003L0115>.
- [91] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/52/ES: kterou se mění směrnice 95/2/ES o potravinářských přídatných látkách jiných než barviva a náhradní sladidla a směrnice 94/35/ES o náhradních sladidlech pro použití v potravinách. 2006. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0052&from=ES>.
- [92] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *Trac Trends in Analytical Chemistry*. 2009, 28(9), 1082-1102. ISSN 01659936. DOI:10.1016/j.trac.2009.06.008.
- [93] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK, Agata KOT-WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 400(7), 2159-2172. ISSN 1618-2642.
- [94] DEMIRALAY, E. Çubuk, G. ÖZKAN a Z. GUZEL-SEYDIM. Isocratic Separation of Some Food Additives by Reversed Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*. 2006, 63(1-2), 91-96. ISSN 0009-5893. DOI: 10.1365/s10337-005-0683-8.

- [95] DOSSI, N., R. TONIOLO, S. SUSMEL, A. PIZZARIELLO a G. BONTEMPELLI. Simultaneous RP-LC Determination of Additives in Soft Drinks. *Chromatographia*. 2006, 63(11-12), 557-562. ISSN 0009-5893. DOI: 10.1365/s10337-006-0793-y.
- [96] YANG, Da-jin a Bo CHEN. Simultaneous Determination of Nonnutritive Sweeteners in Foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57(8), 3022-3027. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf803988u.
- [97] KOYAMA, Masamichi, Kazuo YOSHIDA, Nobutake UCHIBORI, Ichirou WADA, Kazuyuki AKIYAMA a Tamami SASAKI. Analysis of Nine Kinds of Sweeteners in Foods by LC/MS. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2005, 46(3), 72-78. ISSN 0015-6426. DOI: 10.3358/shokueishi.46.72.
- [98] KUBICA, Paweł, Jacek NAMIEŚNIK a Andrzej WASIK. Determination of eight artificial sweeteners and common Stevia rebaudiana glycosides in non-alcoholic and alcoholic beverages by reversed-phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, 407(5), 1505-1512. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-014-8355-x.
- [99] SASAKI, Takahiro, Shoichi TAHARA, Narue SAKAMAKI, Yuki SADAMASU, Keiko USHIYAMA, Kimio MONMA a Chigusa KOBAYASHI. Determination of Aspartame, Acesulfame Potassium, and Sucralose in Chewing Gum by Dialysis Extraction. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2019, 60(6), 176-182. ISSN 0015-6426. DOI: 10.3358/shokueishi.60.176.
- [100] KOBAYASHI, Miki, Hisaya TERADA a Masahiro NAKAJIMA. Determination Method of Ultra-High-Intensity Sweetener, Advantame, in Processed Foods by HPLC and LC-MS/MS. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2015, 56(1), 14-18. ISSN 0015-6426. DOI: 10.3358/shokueishi.56.14.
- [101] MATSUMOTO, Hiroko, Keiko HIRATA, Narue SAKAMAKI, Kayo HAGINO a Hirofumi USHIYAMA. Simultaneous Determination of Neotame, Alitame and Aspartame in Foods by HPLC. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2008, 49(1), 31-36. ISSN 0015-6426.
- [102] LIU, X., L. DING, J. LIU, Y. ZHANG, Z. HUANG, L. WANG a B. CHEN. Simultaneous determination of six synthetic sweeteners in food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. PMID: 21381416.
- [103] FERRER, Imma a E. Michael THURMAN. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(25), 4127-4134. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.02.020.
- [104] TIGHRINE, Abderrahmane, Youcef AMIR, Pilar ALFARO, Marzouk MAMOU a Cristina NERÍN. Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2019, 586-594. ISSN 03088146.
- [105] ORDÓÑEZ, Edgar Y., José Benito QUINTANA, Rosario RODIL a Rafael CELA. Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012, 197-205. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.073.
- [106] ARMENTA, Sergio, Salvador GARRIGUES a Miguel DE LA GUARDIA. FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(26), 7798-7803. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf049218l.

- [107] MA, Kang, Xiaojia LI, Yiwen ZHANG a Fei LIU. Determining High-Intensity Sweeteners in White Spirits Using an Ultrahigh Performance Liquid Chromatograph with a Photo-Diode Array Detector and Charged Aerosol Detector. *Molecules*. 2020, 25(1). ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules25010040.
- [108] RAMSURN, DOUSHI D., ABINA JHAUMEER LAULLOO a MINU G. BHOWON. Determination of artificial sweeteners in liquid foods by high performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*. Dostupné z: <https://ijpda.com/index.php/journal/article/view/176>.
- [109] FERRER, Imma, Jerry A. ZWEIGENBAUM a E. Michael THURMAN. Analytical Methodologies for the Detection of Sucralose in Water. *Analytical Chemistry*. 2013, 85(20), 9581-9587. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac4016984.
- [110] CHEN, Qing-chuan, Shi-fen MOU, Ke-na LIU, Zu-ying YANG a Zhe-ming NI. Separation and determination of four artificial sweeteners and citric acid by high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997, 771(1-2), 135-143. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)00067-8.
- [111] ZHU, Yan, Yingying GUO, Mingli YE a Frits S. JAMES. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1085(1), 143-146. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.042.
- [112] SPANGENBERG, Bernd, Jörg STROKA, Isabel ARRANZ a Elke ANKLAM. *A Simple and Reliable HPTLC Method for the Quantification of the Intense Sweetener Sucralose*. 2006, 26(16), 2729-2739. ISSN 1082-6076. DOI:10.1081/JLC-120024543.
- [113] MONSEN, Paige J. a Frederick A. LUZZIO. Isolation and Derivatization of Sucralose from an Artificial Sweetener to Provide a Hands-On Laboratory Experiment Emphasizing Synthesis and Purification. *Journal of Chemical Education*. 2019, 96(5), 992-997. ISSN 0021-9584. DOI: 10.1021/acs.jchemed.8b00413.
- [114] GALLETTI, Guido C., Giuseppe CHIAVARI a Paola BOCCHINI. Thermal decomposition products of aspartame as determined by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 1995, 137-151. ISSN 01652370. DOI: 10.1016/0165-2370(94)00868-2.
- [115] HERRMANNOVÁ, Michaela, Ludmila KŘIVÁNKOVÁ, Martin BARTOŠ a Karel VYTRÁS. Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis. *Journal of Separation Science*. 2006, 29(8), 1132-1137. ISSN 1615-9306. DOI: 10.1002/jssc.200500441.
- [116] AN, Ji-Yong, Shavkatjon AZIZOV, Avvaru Praveen KUMAR a Yong-Il LEE. Quantitative Analysis of Artificial Sweeteners by Capillary Electrophoresis with a Dual-Capillary Design of Molecularly Imprinted Solid-Phase Extractor. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2018, 39(11), 1315-1319. ISSN 12295949.
- [117] GARCÍA-JIMÉNEZ, J. F., M. C. VALENCIA a L. F. CAPITÁN-VALLVEY. Improved Multianalyte Determination of the Intense Sweeteners Aspartame and Acesulfame-K with a Solid Sensing Zone Implemented in an FIA Scheme. *Analytical Letters*. 2006, 39(7), 1333-1347. ISSN 0003-2719.
- [118] MEDEIROS, Roberta Antigo, Adriana Evaristo de CARVALHO, Romeu C. ROCHA-FILHO a Orlando FATIBELLO-FILHO. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta*. 2008, 76(3), 685-689. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.04.015.

- [119] NIKOLELIS, Dimitrios P. a Spyros PANTOULIAS. Selective Continuous Monitoring and Analysis of Mixtures of Acesulfame-K, Cyclamate, and Saccharin in Artificial Sweetener Tablets, Diet Soft Drinks, Yogurts, and Wines Using Filter-Supported Bilayer Lipid Membranes. *Analytical Chemistry*. 2001, 73(24), 5945-5952. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac010559x.
- [120] NI, Yongnian, Weiqiang XIAO a Serge KOKOT. A differential kinetic spectrophotometric method for determination of three sulphanilamide artificial sweeteners with the aid of chemometrics. *Food Chemistry*. 2009, 113(4), 1339-1345. ISSN 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.068.
- [121] LLAMAS, Natalia E., María S. DI NEZIO, Miriam E. PALOMEQUE a Beatriz S. FERNÁNDEZ BAND. Direct Determination of Saccharin and Acesulfame-K in Sweeteners and Fruit Juices Powders. *Food Analytical Methods*. 2008, 1(1), 43-48. ISSN 1936-9751. DOI: 10.1007/s12161-007-9006-z.
- [122] ARMENTA, Sergio, Salvador GARRIGUES a Miguel DE LA GUARDIA. FTIR Determination of Aspartame and Acesulfame-K in Tabletop Sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, 52(26), 7798-7803. ISSN 0021-8561.
- [123] KOKOTOU, Maroula G. a Nikolaos S. THOMAIDIS. Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*. 2013, 5(16). ISSN 1759-9660.
- [124] SALAS, Daniela, Francesc BORRULL, Núria FONTANALS a Rosa Maria MARCÉ. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry to determine artificial sweeteners in environmental waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, 407(15), 4277-4285. ISSN 1618-2642.
- [125] JIANG, Wen, Jonas HENSCHER, Alexander SCHRIEWER a Heiko HAIEN. *Analysis of Artificial Sweeteners by HILIC-MS Method*. Institute of Inorganic and Analytical Chemistry: University of Münster. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/327666582_Analysis_of_Artificial_Sweeteners_by_HILIC-MS_Method.
- [126] KUBICA, Paweł, Jacek NAMIEŚNIK a Andrzej WASIK. Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 184-192. ISSN 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.01.006.
- [127] PITSCH, Johannes a Julian WEGHUBER. Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled with Charged Aerosol Detection for Simultaneous Quantitation of Carbohydrates, Polyols and Ions in Food and Beverages. *Molecules*. 2019, 24(23). ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules24234333.
- [128] ŠIMOROVÁ, Lenka. *Vývoj separačních metod pro analýzu umělých sladidel*. 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Jan Fischer, CSc.
- [129] LISTÍK, Petr. *Využití moderních analytických technik pro analýzu mykotoxinů v obilovinách*. 2019. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
- [130] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [131] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. *Talanta*. 2010, 82(5), 1742-1748. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.070.

- [132] SCHEURER, Marco, Heinz-J. BRAUCH a Frank T. LANGE. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 394(6), 1585-1594. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-009-2881-y.
- [133] Adsorbenty a chemicky vázané fáze. *HPLC.cz*. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_1_Polar_sorbent.
- [134] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova*. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
- [135] SCHULZOVÁ, Věra. HPLC v analýze potravin a přírodních produktů. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202019%20teorie.pdf>.
- [136] VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova*. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>.
- [137] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *VŠCHT Praha*. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_1.pdf.
- [138] Detektory v HPLC. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Ústav analýzy potravin a výživy*. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/8%20HPLC%202019%20detektory.pdf>.
- [139] Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC. *Hplc.cz*. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/hilic.html#_Model_2.
- [140] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 402(1), 231-247. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [141] MARRUBINI, Giorgio, Patrik APPELBLAD, Mariarosa MAIETTA a Adele PAPETTI. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chemistry*. 2018, 53-66. ISSN 03088146.
- [142] MCCALLEY, David V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2017, 49-71. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2017.06.026.
- [143] JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín*. Katedra analytické chemie: Univerzita Pardubice. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf.
- [144] MCCALLEY, David V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(20), 3408-3417. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.03.011.
- [145] CVAČKA, Josef. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *Univerzita Karlova*. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>.
- [146] DUŠKOVÁ, Šárka. Analytická technika HPLC-MS/MS a možnosti jejího využití v hygieně. *Státní zdravotní ústav*. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Vzdelavaci_akce/CHPPL/KD_150924/04_Duskova_S_S_ZU.pdf
- [147] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie. *Holcapek.upce.cz*. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf

- [148] WASIK, Andrzej, Josephine MCCOURT a Manuela BUCHGRABER. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection—Development and single-laboratory validation. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1157(1-2), 187-196. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.04.068
- [149] BIDLINGMEYER, Brian A. a Stefan SCHMITZ. The analysis of artificial sweeteners and additives in beverages by HPLC: An undergraduate experiment. *Journal of Chemical Education*. 1991, 68(8). ISSN 0021-9584. DOI: 10.1021/ed068pA195.
- [150] ŠTĚPÁNOVÁ, Hana. *Analýza umělých sladidel v potravinách*. Pardubice, 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Doc. Ing. Jan Fischer, CSc.
- [151] PRODOLLIET, Jacques a Milene BRUELHART. Determination of Aspartame and Its Major Decomposition Products in Foods. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1993, 76(2), 275-282. ISSN 1060-3271. DOI: 10.1093/jaoac/76.2.275.
- [152] LAWRENCE, James F a Claudette F CHARBONNEAU. Determination of Seven Artificial Sweeteners in Diet Food Preparations by Reverse-Phase Liquid Chromatography with Absorbance Detection. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1988, 71(5), 934-937. ISSN 0004-5756. DOI: 10.1093/jaoac/71.5.934.
- [153] KOKOTOU, Maroula G. a Nikolaos S. THOMAIDIS. Characterization of the Retention of Artificial Sweeteners by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Analytical Letters*. 2018, 51(1-2), 49-72. ISSN 0003-2719.
- [154] KOZLÍK, Petr. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. *Univerzita Karlova: Katedra analytické chemie*. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC_MS_MS.pdf
- [155] Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2016, 1-16. Dostupné z: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

Přílohy

TABULKY:

Tabulka P 1: Retenční faktory umělých sladidel při použití 10 mmol/l mravenčanu amonného

HCOOH	% ACN	SUC	ASP	ACE	SAC	CYC
pH5	70	0,9388	1,8571	4,3061	5,1633	6,4694
	75	0,9388	2,1429	4,1633	5,0816	6,6735
	80	0,9388	3,2653	3,9796	4,9388	7,1429
	85	1,0204	6,5306	3,9388	5,0408	8,3061
	90	1,1633	20,9796	5,3469	6,1633	11,4490
pH4	70	0,9184	1,3673	5,4898	6,6939	8,6939
	75	0,9388	1,6939	5,1224	6,3673	8,8980
	80	0,9592	2,4286	4,8163	6,1429	9,3469
	85	1,0408	4,7143	4,6122	5,9592	10,4082
	90	1,1633	16,1224	5,2449	6,2041	12,7551
pH3	70	0,2449	0,5102	5,6531	7,0000	9,7347
	75	0,2653	0,7959	5,2245	6,6735	10,0612
	80	0,2857	1,4490	4,9184	6,5102	10,8776
	85	0,4082	3,3061	4,7347	6,4694	12,5102
	90	0,5306	11,9388	4,6735	6,4490	15,7959

Tabulka P 2: Retenční faktory umělých sladidel při použití 10 mmol/l octanu amonného

CH ₃ COOH	% ACN	SUC	ASP	ACE	SAC	CYC
pH5	70	0,2653	1,0408	3,1633	3,8980	4,8776
	75	0,3061	1,6531	2,6735	3,3469	4,5102
	80	0,3061	2,9184	2,4082	3,0612	4,5102
	85	0,3878	6,6939	3,0000	3,4082	4,9388
	90	0,4898	24,5510	2,7755	4,0816	7,3265
pH4	70	0,2653	0,7143	3,8571	4,7551	6,2245
	75	0,2857	1,0612	3,4490	4,3673	6,1224
	80	0,3061	1,8163	3,0612	3,9796	6,1633
	85	0,4082	4,2041	2,8571	3,6122	6,4082
	90	0,5102	15,8980	3,0408	4,0204	7,9388
pH3	70	0,2653	0,5510	5,0816	6,2449	8,3878
	75	0,2857	0,8163	4,6327	5,8163	8,4694
	80	0,3061	1,4694	4,1837	5,3878	8,7347
	85	0,4286	3,2653	3,6939	4,9796	9,2857
	90	0,5306	10,9184	4,4490	5,3878	10,5306

Tabulka P 3: Retenční faktory umělých sladidel při různých koncentracích octanu amonného

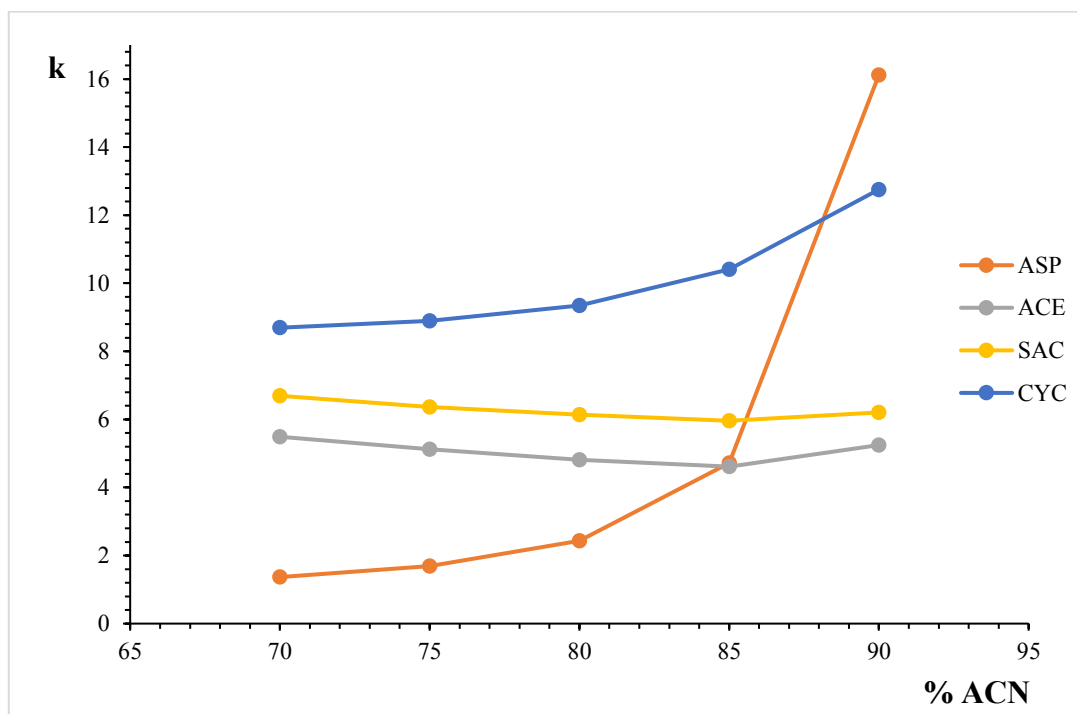
% ACN	c [mmol/l]	SUC	ASP	ACE	SAC	CYC
70	5	0,2857	1,3265	4,4694	5,4490	6,8367
	10	0,2653	1,0408	3,1633	3,8980	4,8776
	15	0,3061	1,0408	2,0408	2,4694	3,1429
75	5	0,3265	2,0816	4,1224	5,1224	6,8776
	10	0,3061	1,6531	2,6735	3,3469	4,5102
	15	0,3878	1,5306	1,7755	2,2449	3,0612
80	5	0,3469	3,6735	3,5714	4,5102	6,6735
	10	0,3061	2,9184	2,4082	3,0612	4,5102
	15	0,4898	2,6531	1,6327	2,0612	3,0816
85	5	0,4490	8,3673	3,3673	4,1429	6,9796
	10	0,3878	6,6939	3,0000	3,4082	4,9388
	15	0,5918	5,8776	1,4898	1,9388	3,3673
90	5	0,5510	30,7347	2,8367	4,0000	8,8980
	10	0,4898	24,5510	2,7755	4,0816	7,3265
	15	0,8776	20,9184	1,4082	2,0000	4,5102

Tabulka P 4: Retenční faktory umělých sladidel při různých koncentracích octanu amonného s přidavkem pufru do ACN

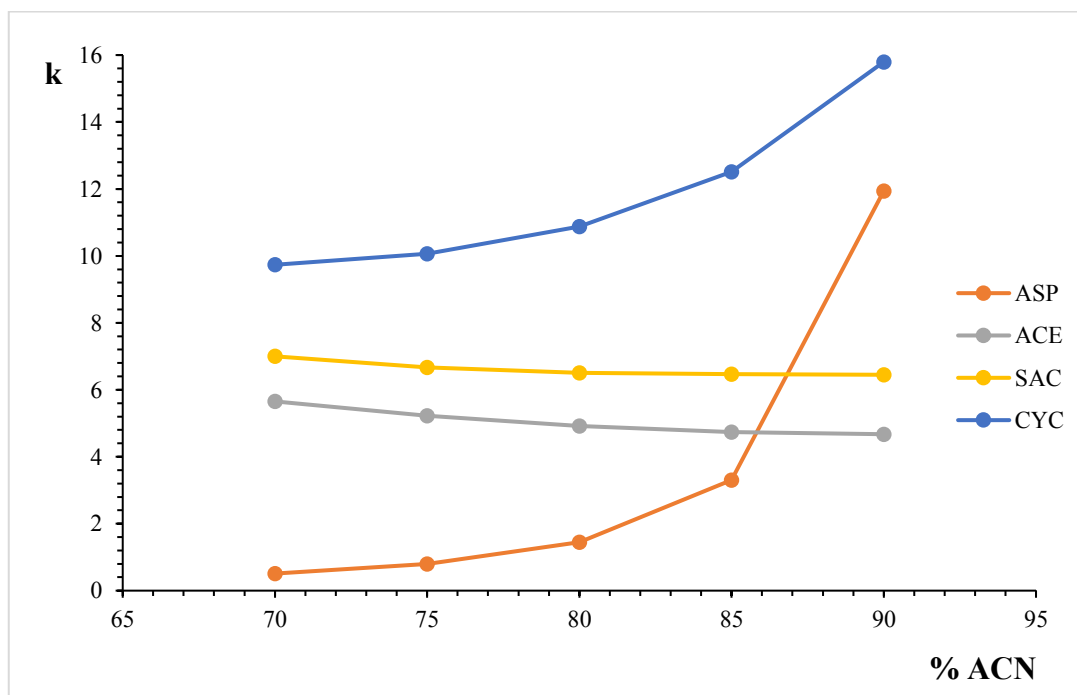
koncentrace	% ACN*	SUC*	ASP*	ACE*	SAC*	CYC*
5 mmol/l	70	0,3061	0,9796	2,7959	3,3878	4,2245
	75	0,3469	1,3469	2,2449	2,7755	3,7143
	80	0,4490	2,1020	1,7143	2,2041	3,2449
	85	0,5510	3,9184	1,3878	1,7959	2,9592
	90	0,7347	10,1837	1,0612	1,4490	2,9796
10 mmol/l	70	0,2857	0,8980	1,2653	1,5102	1,8571
	75	0,3061	1,2449	1,2449	1,3673	1,6735
	80	0,3265	1,8367	0,9184	1,2041	1,8367
	85	0,4286	3,1837	0,7347	0,9592	1,6939
	90	0,5918	7,6327	0,5918	0,8980	1,8776
15 mmol/l	70	0,3061	0,9184	1,1429	1,4286	1,7959
	75	0,3469	1,2653	1,0000	1,2245	1,5102
	80	0,4490	1,9184	0,8367	1,0408	1,5102
	85	0,5714	3,3265	0,7143	0,9388	1,5306
	90	0,7755	8,1224	0,6735	0,8776	1,8367

* Naměřeno s přidavkem soli do mobilní složky B (ACN)

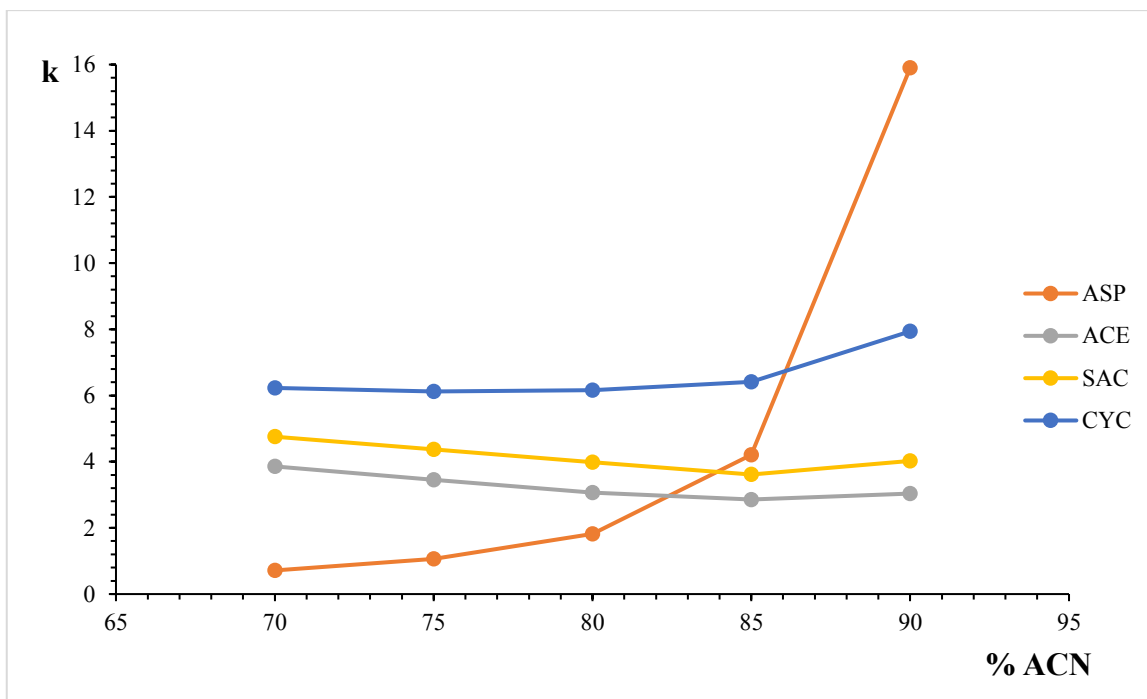
OBRÁZKY:



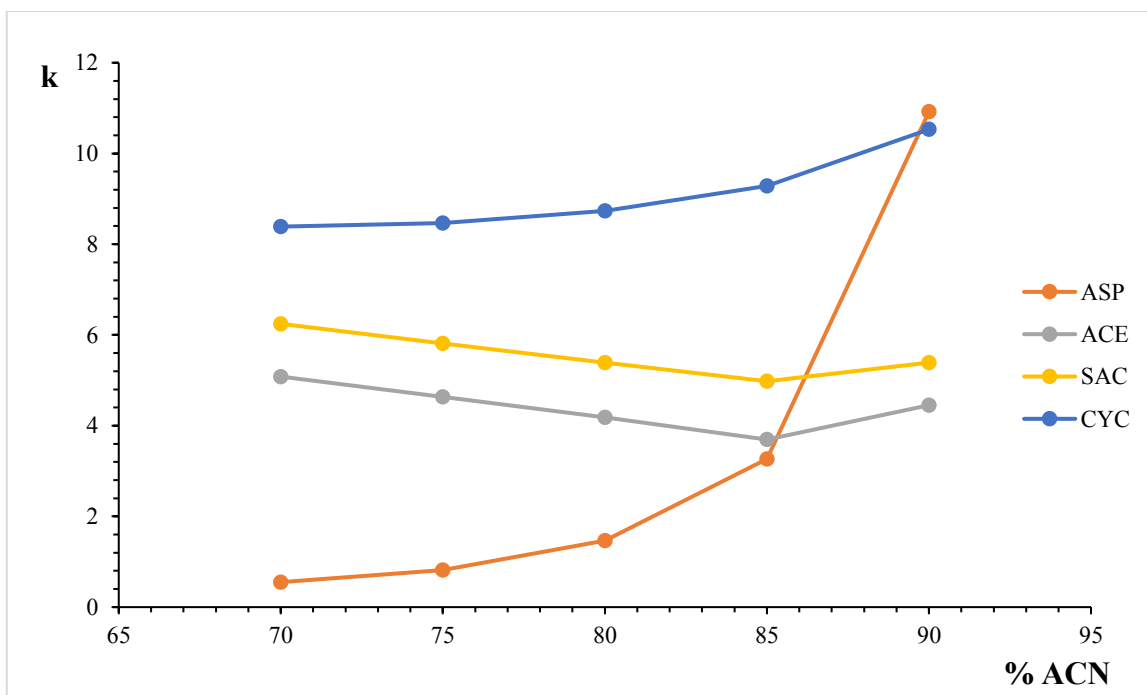
Obrázek P 1: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující HCOONH₄ (c = 10 mmol/l, pH=4)



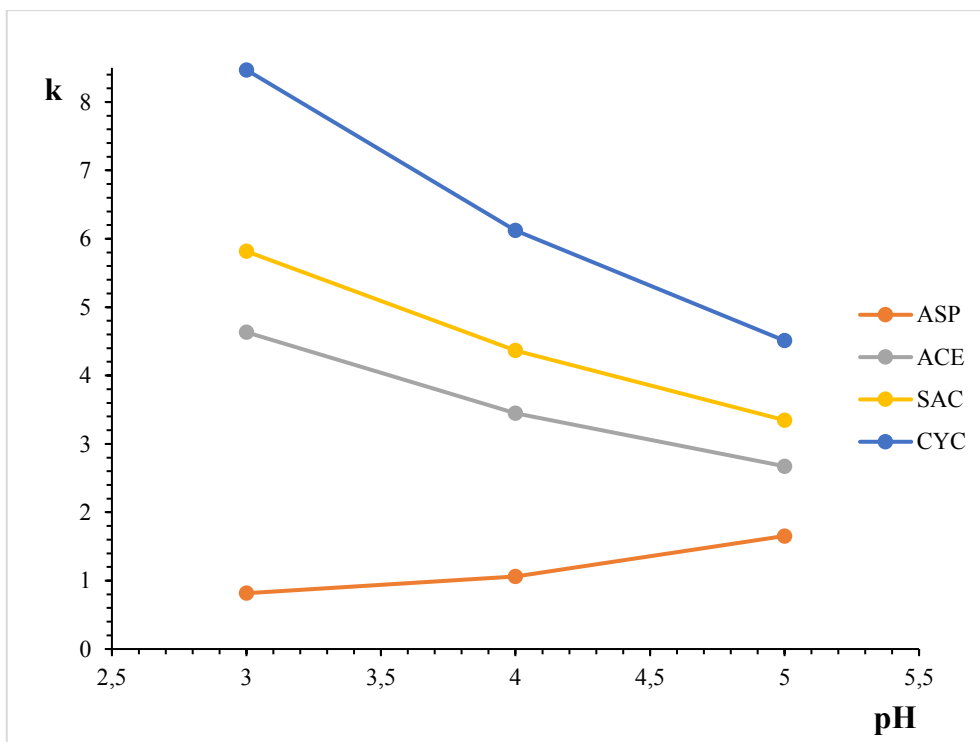
Obrázek P 2: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující HCOONH₄ (c = 10 mmol/l, pH=3)



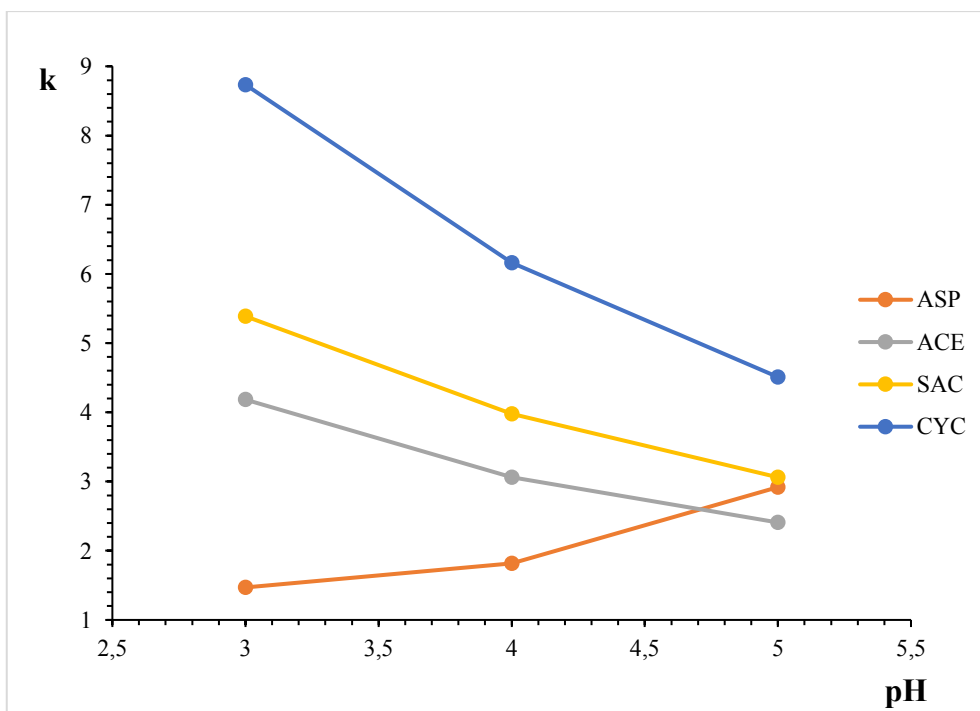
Obrázek P 3: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=4$)



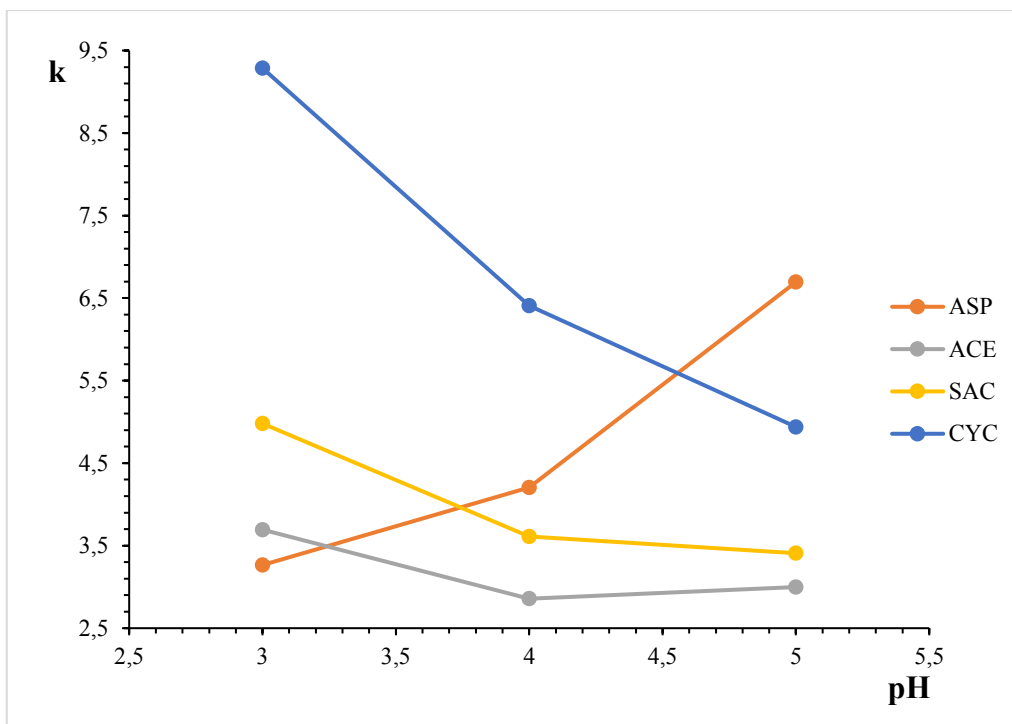
Obrázek P 4: Závislost retenčního faktoru na obsahu ACN v mobilní fázi obsahující $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($c = 10 \text{ mmol/l}$, $\text{pH}=3$)



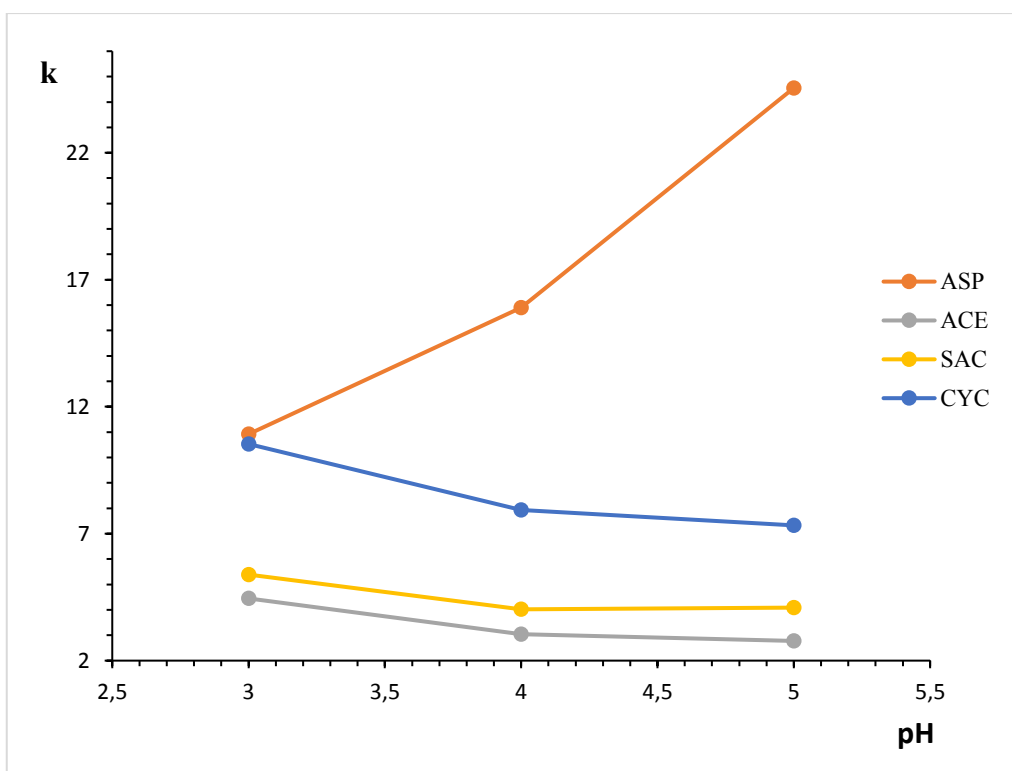
Obrázek P 5: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a ACN s obsahem 75 %



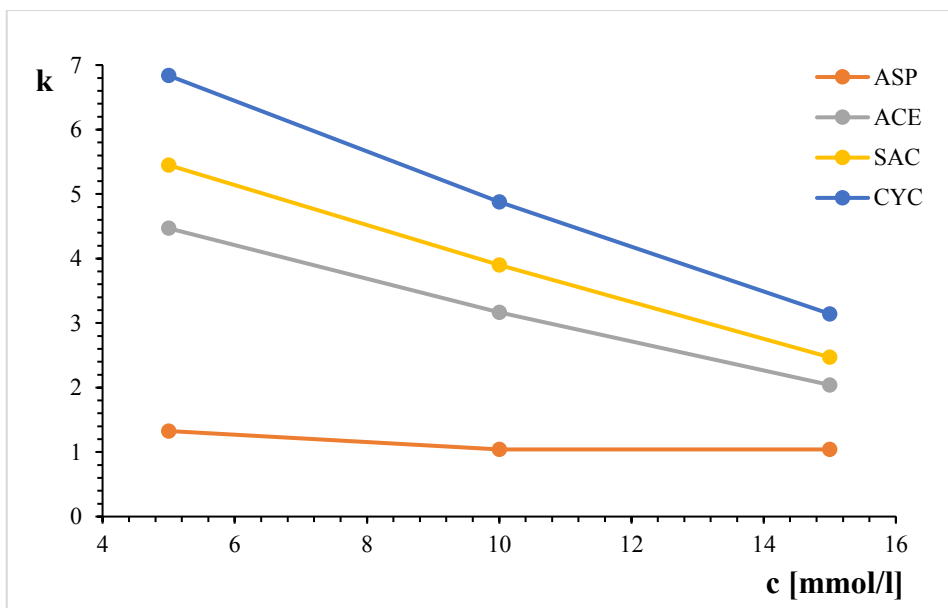
Obrázek P 6: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a ACN s obsahem 80 %



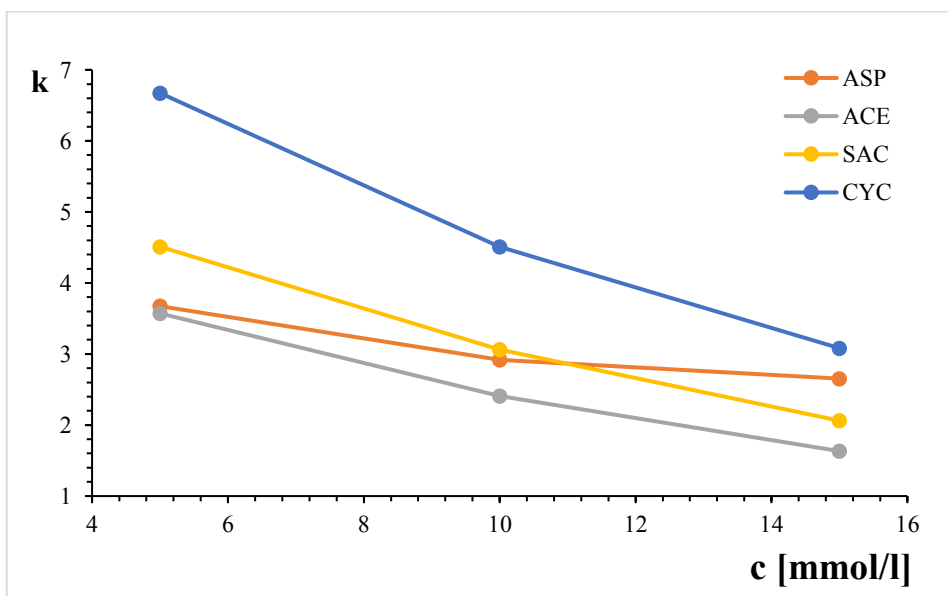
Obrázek P 7: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a ACN s obsahem 85 %



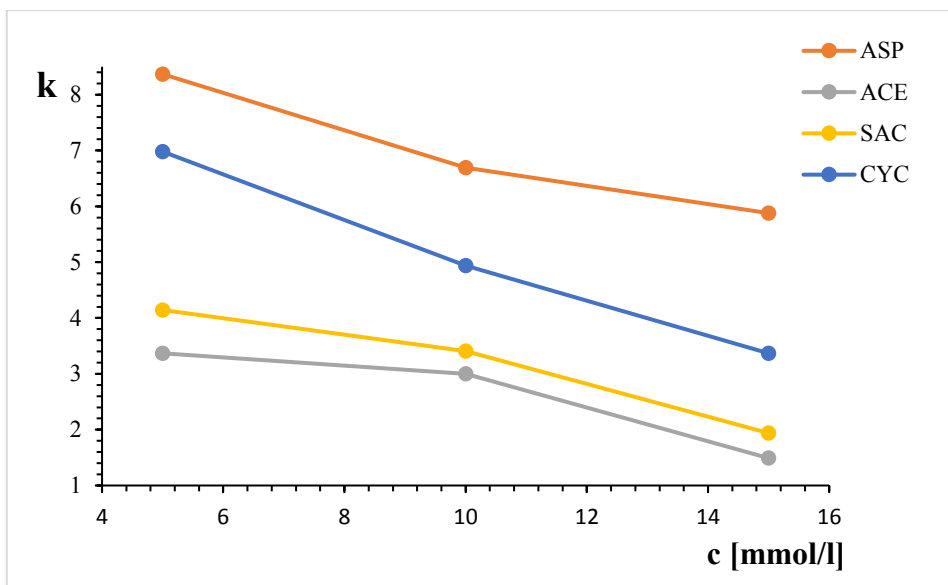
Obrázek P 8: Závislost retenčního faktoru na pH mobilní fáze složené z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a ACN s obsahem 90 %



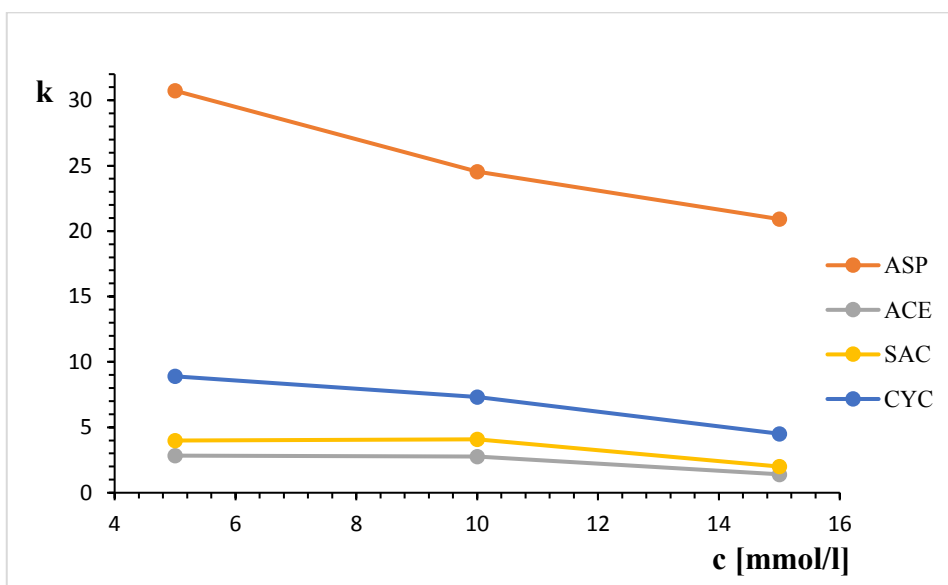
Obrázek P 9: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 70% ACN



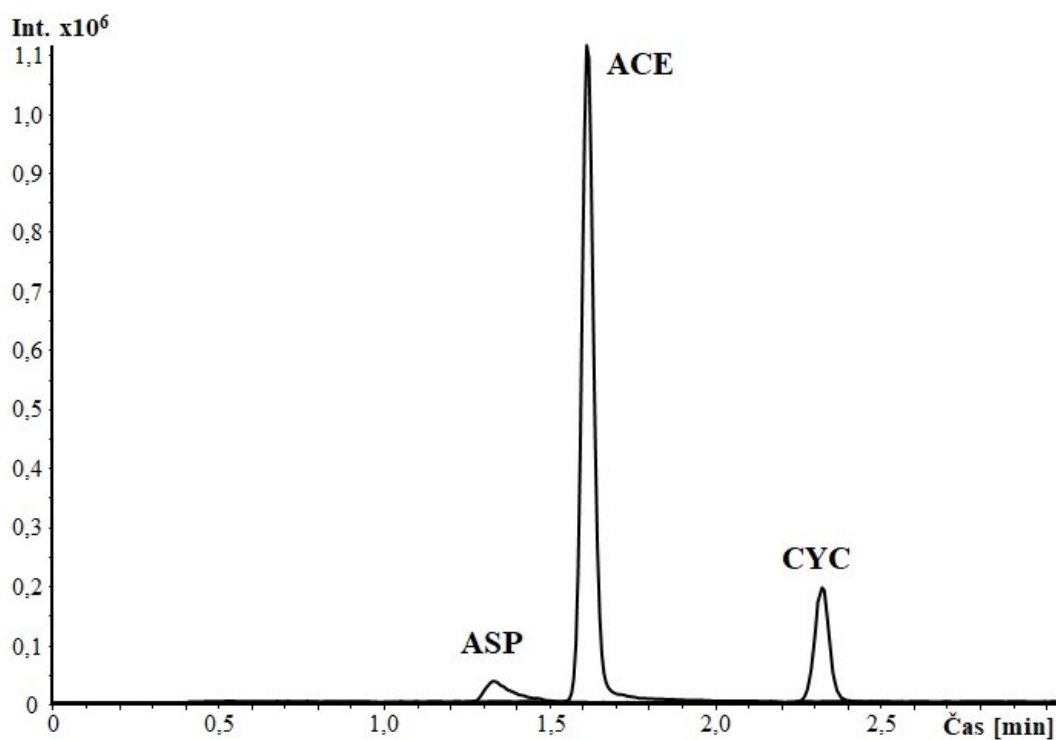
Obrázek P 10: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 80 % ACN



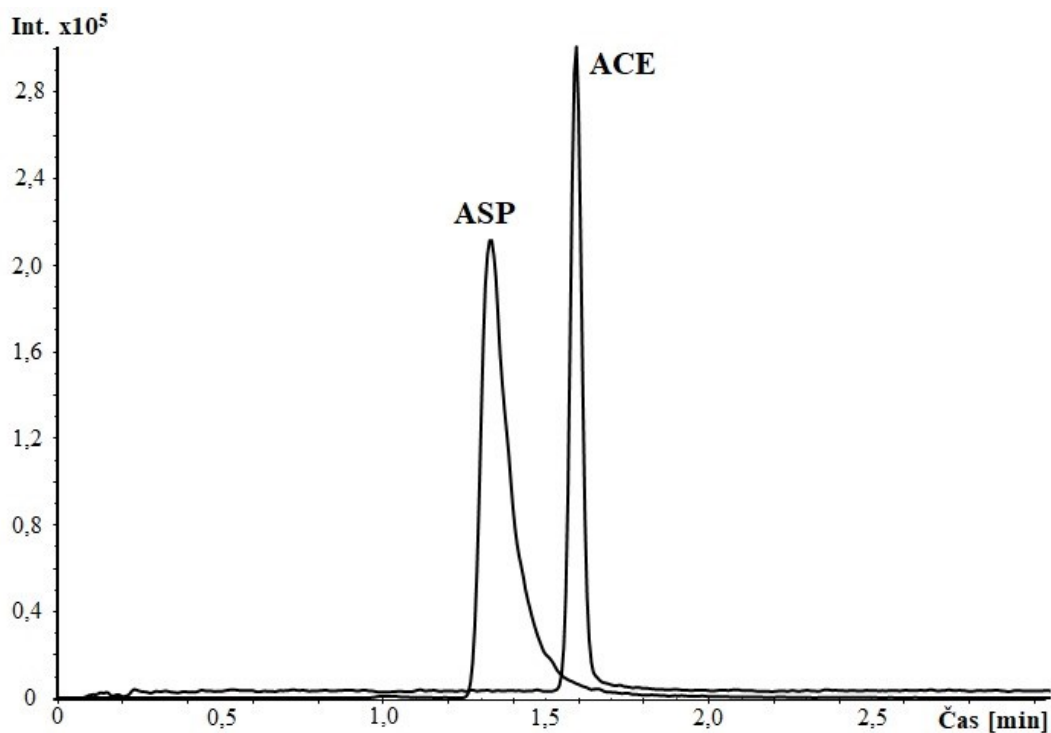
Obrázek P 11: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 85 % ACN



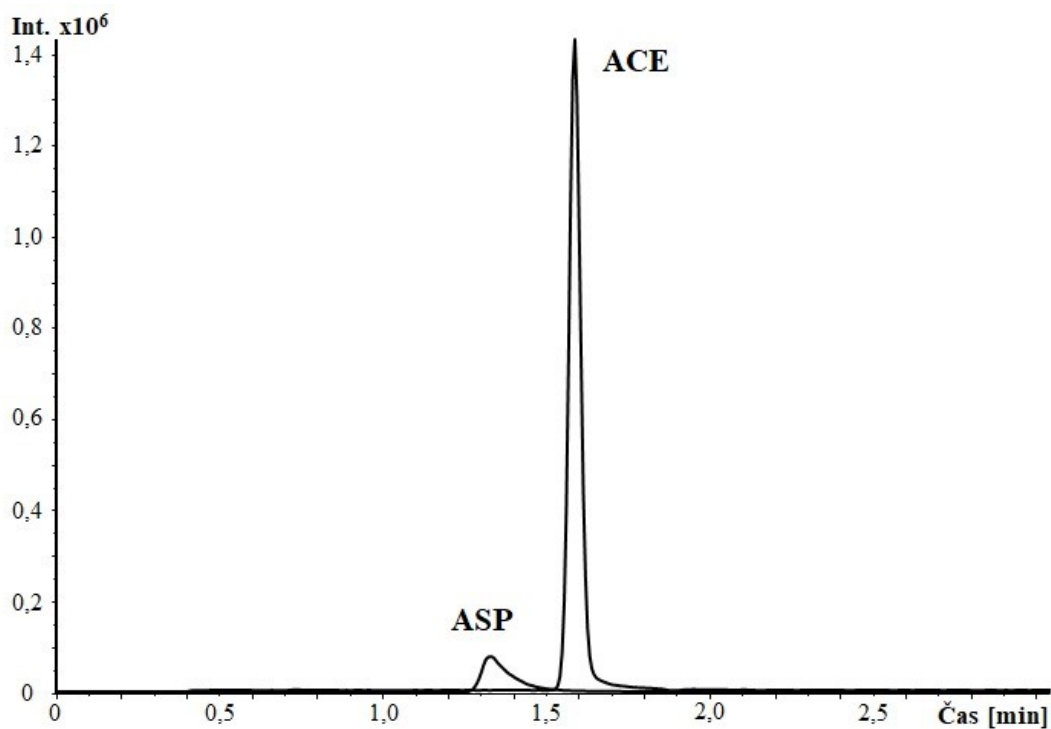
Obrázek P 12: Závislost retenčního faktoru na koncentraci pufru v mobilní fázi s obsahem 90 % ACN



Obrázek P 13: Chromatografická separace vzorku limonády Coca Cola Zero. MRM pro ASP, ACE a CYC. Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

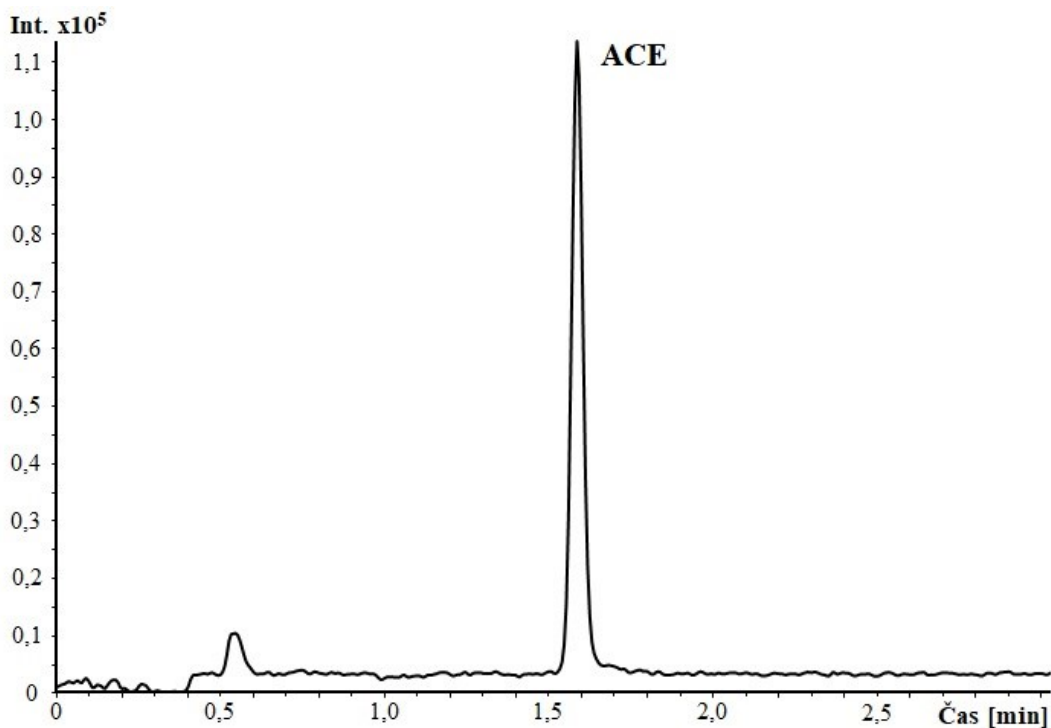


Obrázek P 14: Chromatografická separace vzorku limonády Pepsi Max. MRM pro ASP a ACE. Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



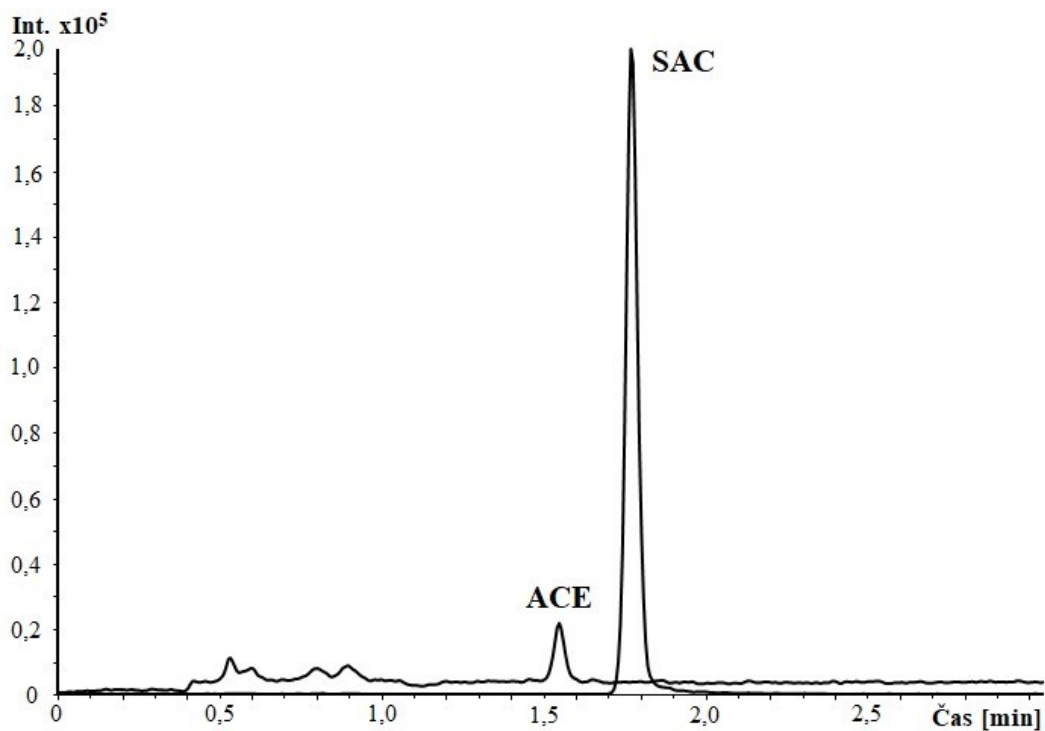
Obrázek P 15: Chromatografická separace vzorku energetického nápoje RedBull. MRM pro ASP a ACE.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

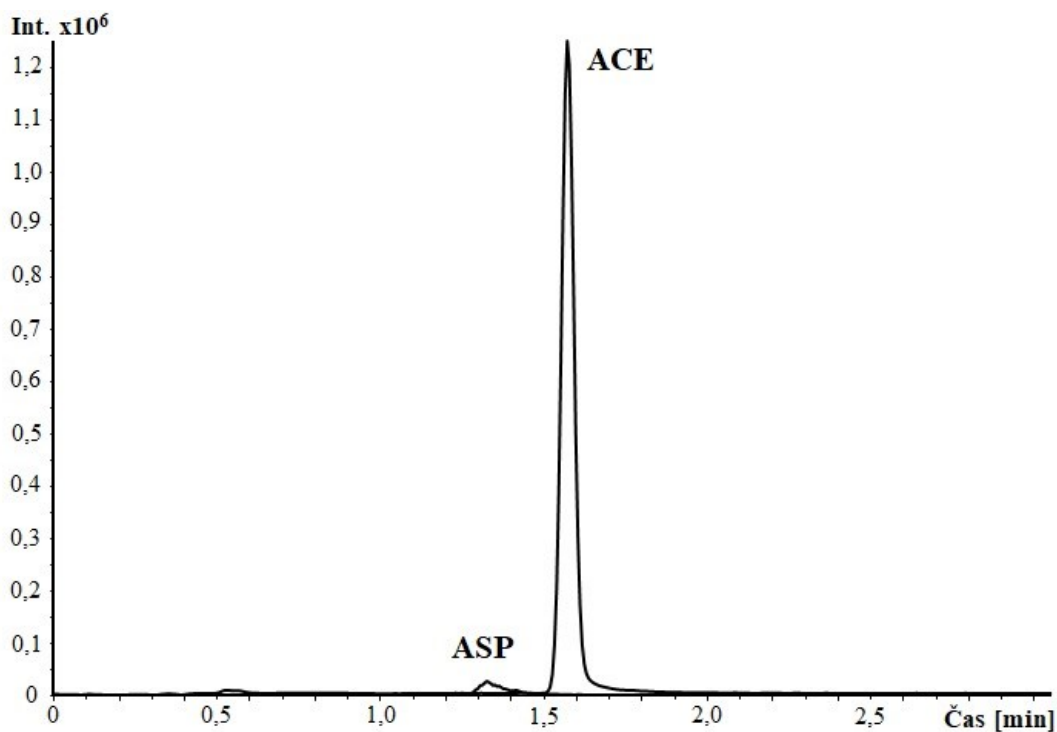


Obrázek P 16: Chromatogram iontového nápoje Getorade se selektivním záznamem iontu ACE.

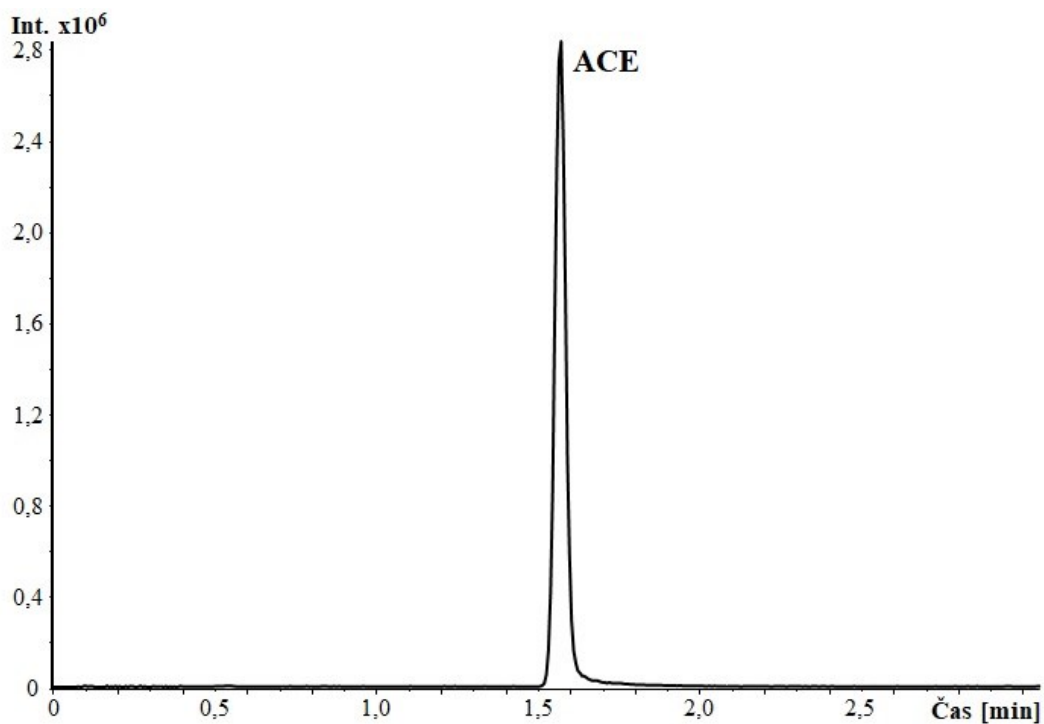
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



Obrázek P 17: Chromatografická separace vzorku energetického nápoje Black Horse. MRM pro ACE a SAC.
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

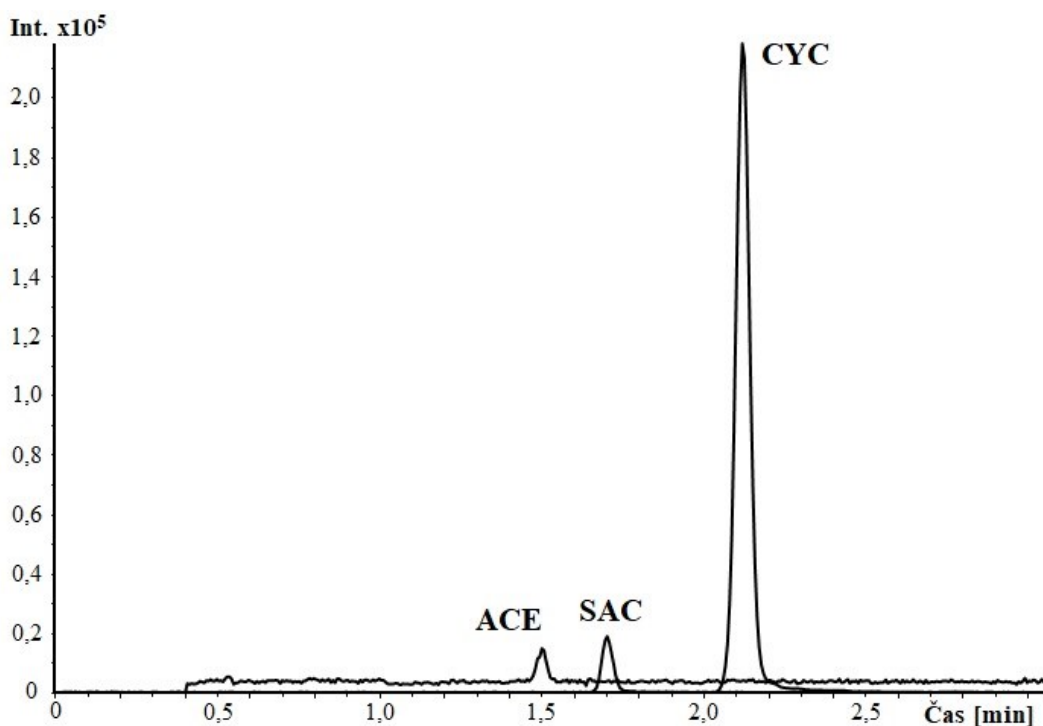


Obrázek P 18: Chromatografická separace vzorku ústní vody Odol classic. MRM pro ASP a ACE.
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



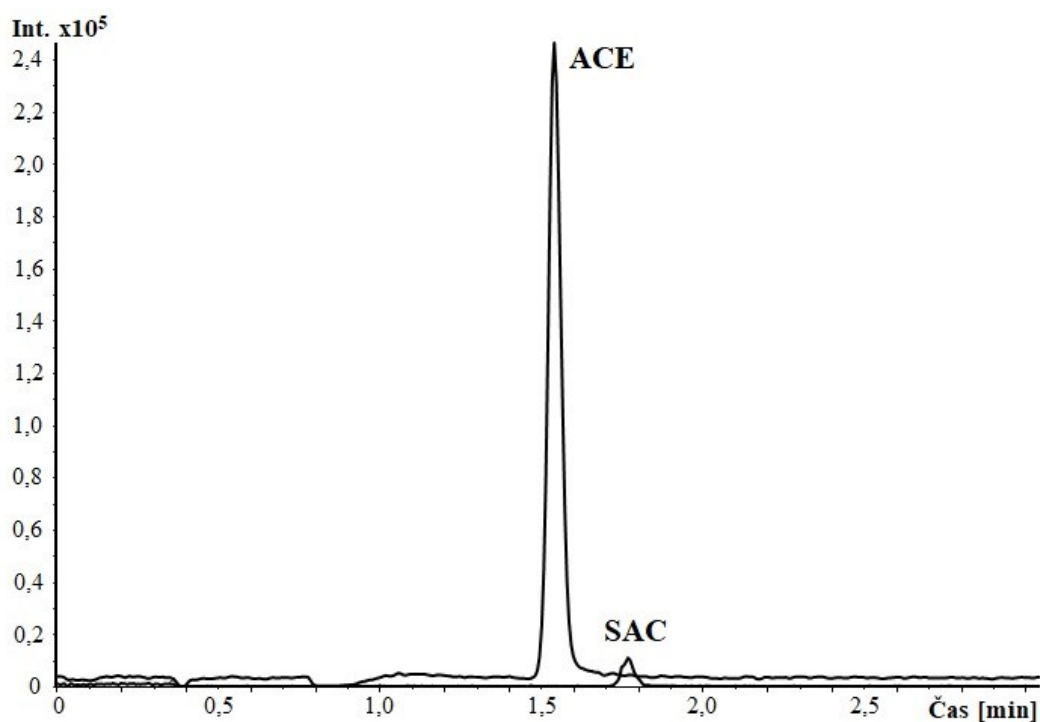
Obrázek P 19: Chromatografická separace vzorku šumivého nápoje Bolero. MRM pro ACE.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μ m); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μ l; MS detekce v MRM režimu



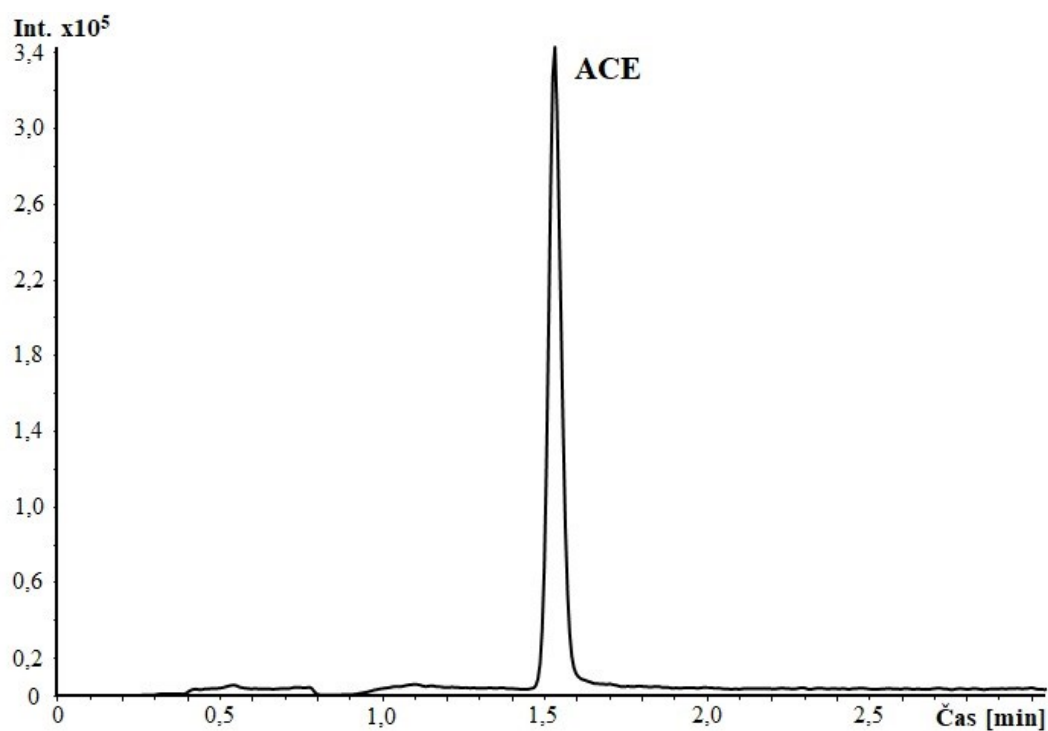
Obrázek P 20: Chromatografická separace vzorku šumivé tablety Hořčíku. MRM pro ACE, SAC a CYC.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μ m); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μ l; MS detekce v MRM režimu



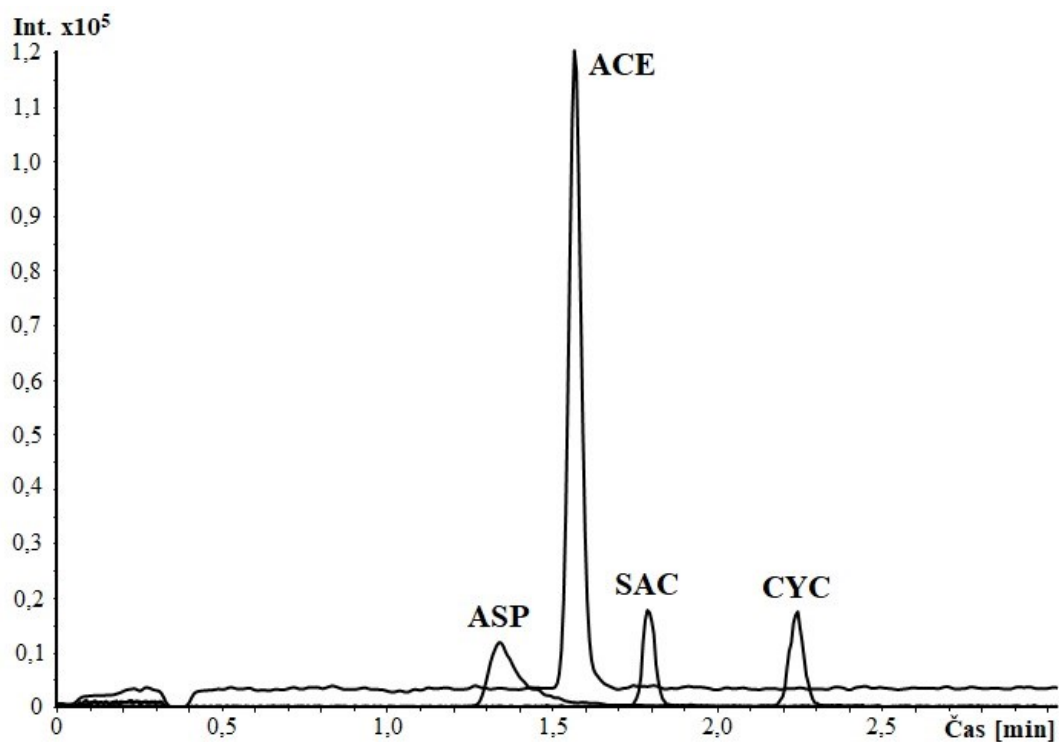
Obrázek P 21: Chromatografická separace vzorku proteinu Myprotein. MRM pro ACE a SAC.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

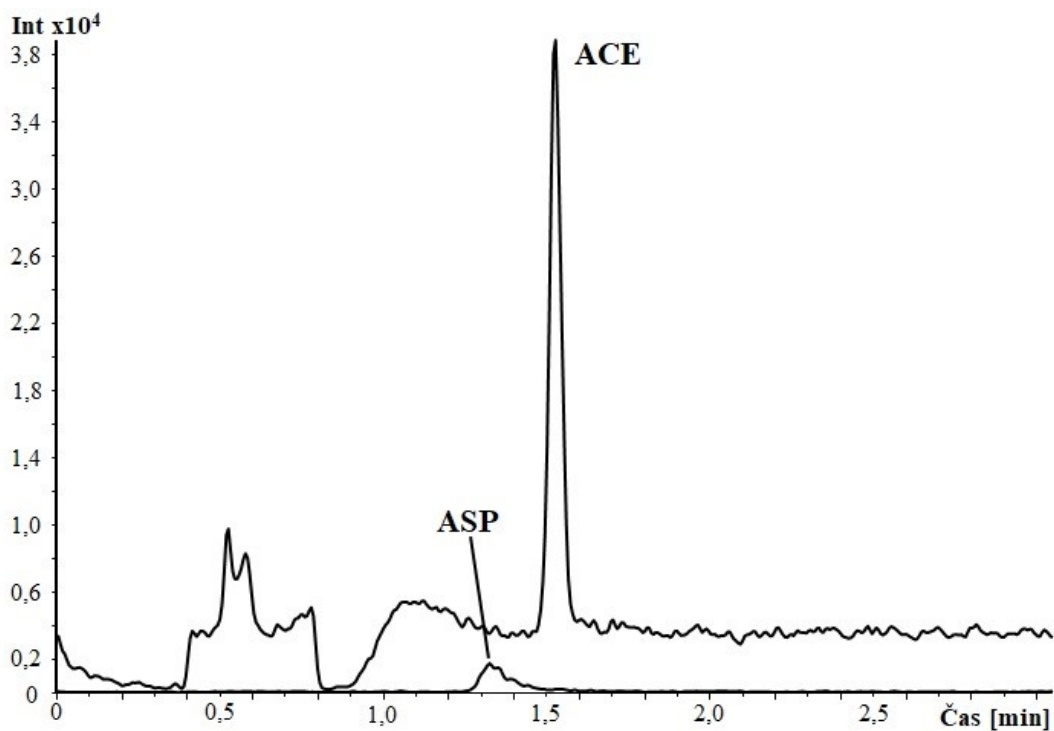


Obrázek P 22: Chromatografická separace vzorku proteinu Bodylab. MRM pro ACE.

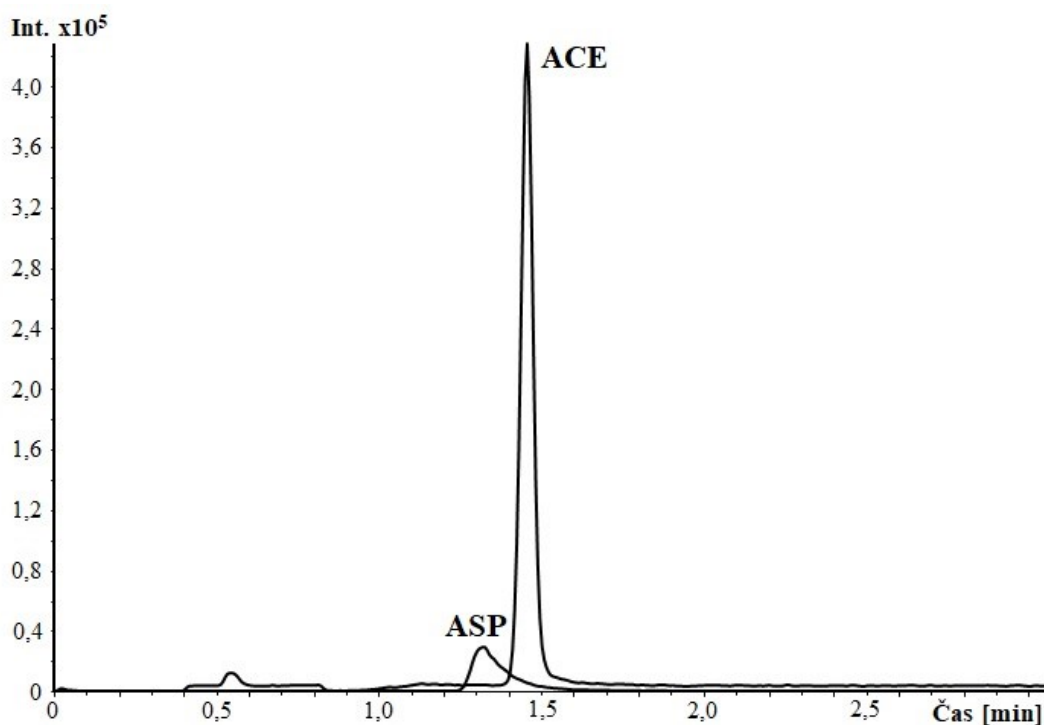
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



Obrázek P 23: Chromatografická separace vzorku ovocného lízátka. MRM pro ASP, ACE, SAC a CYC.
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu

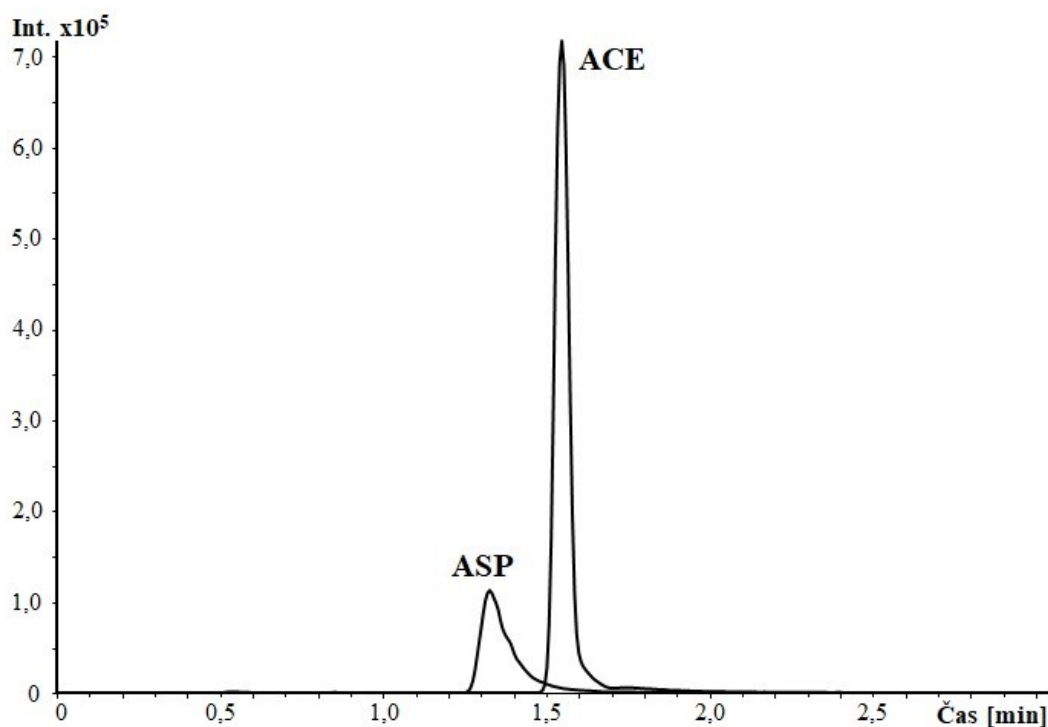


Obrázek P 24: Chromatografická separace vzorku jogurtového nápoje Skyr. MRM pro ASP a ACE.
Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



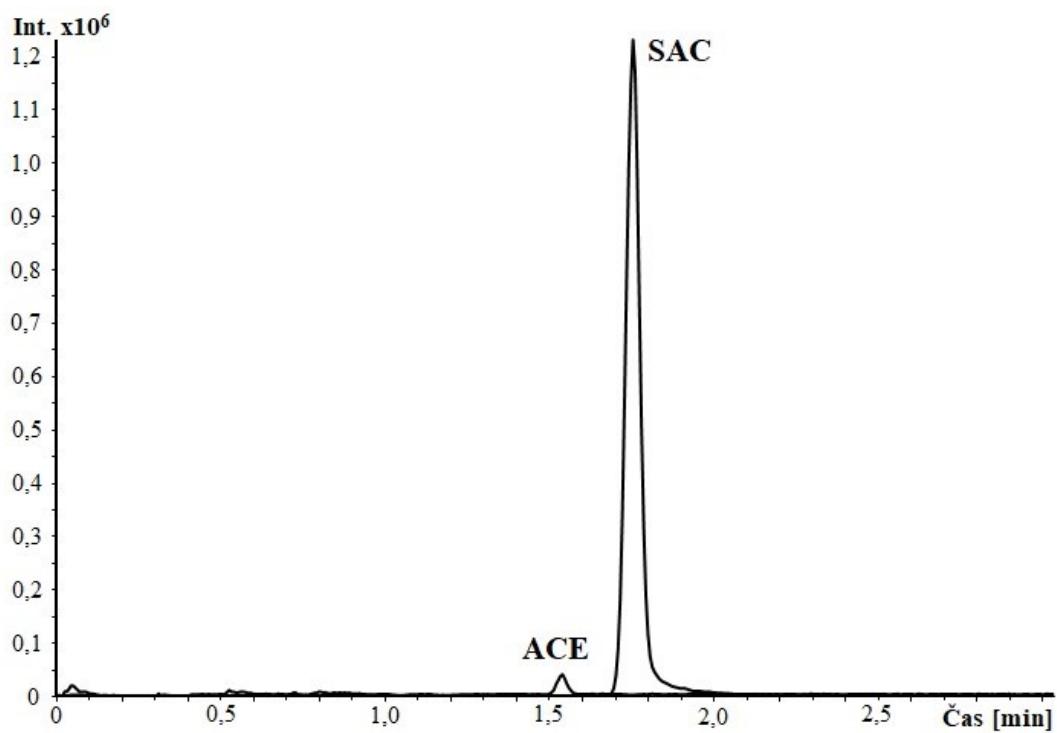
Obrázek P 25: Chromatografická separace vzorku jogurtu Jogobella light. MRM pro ASP a ACE.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



Obrázek P 26: Chromatografická separace vzorku žvýkačky Airwaves. MRM pro ASP a ACE.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μm); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μl; MS detekce v MRM režimu



Obrázek P 27: Chromatografická separace vzorku zubní pasty Odol. MRM pro ACE a SAC.

Kolona Raptor Polar (100 x 2,1 mm; 2,7 μ m); MF A: 10 mmol/l octan amonný o pH=5; MF B: 75 % ACN; izokratická eluce; průtok MF 0,4 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 2 μ l; MS detekce v MRM režimu