



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STANOVENÍ OBSAHU NÁHRADNÍCH SLADIDEL VE ŽVÝKAČKÁCH

DETERMINATION OF SWEETENER SUBSTITUTE CONTENT IN CHEWING GUM

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Sylvie Profousová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1729/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Sylvie Profousová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Stanovení obsahu náhradních sladidel ve žvýkačkách

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracujte literární rešerši k studované problematice
2. Optimalizujte metodu HPLC pro stanovení náhradních sladidel ve žvýkačkách
3. Proveďte analýzu náhradních sladidel v žvýkačkách
4. Zpracujte a vyhodnoťte získané výsledky

### Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.  
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Sylvie Profousová  
studentka

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá simultánním stanovením vybraných náhradních sladidel ve žvýkačkách metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s ELSD detekcí. Teoretická část se věnuje charakterizaci sacharidů a jejich vlivu na zdraví člověka, klasifikaci, charakterizaci vybraných náhradních sladidel a jejich využití. Dále je zde uveden stručný přehled analytických metod, kterými lze sladidla stanovit. Experimentální část je zaměřena na výběr vhodné chromatografické kolony pro jednoduchou identifikaci sedmi sladidel (aspartam, acesulfam K, mannitol, maltitol, sukralóza a xylitol) a optimalizaci složení mobilní fáze. Bylo zjištěno, že není možné jednou univerzální metodou stanovit všechny náhradní sladidla, nicméně s využitím kolony Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) a mobilní fáze acetonitril:voda v poměru 7:93 %<sub>v/v</sub> bylo možné stanovit koncentraci (maltitolu, mannitolu, sorbitolu, sukralózy a xylitolu). Při analýze jednotlivých sladidel muselo být použito různého ředění vzorku, případně muselo být mírně změněno složení mobilní fáze. Koncentrace náhradních sladidel ve žvýkačkách se pohybovala od 0,35 mg/g (sukralóza) do 508 mg/g (xylitol).

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Náhradní sladidla, acesulfam K, aspartam, mannitol, sorbitol, xylitol, sukralóza, maltitol, HPLC, ELSD, žvýkačky

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis deals with the simultaneous determination of selected sweeteners in chewing gum by high-performance liquid chromatography with ELSD detection. The theoretical part is devoted to the characterization of carbohydrates and their effect on human health, classification, characterization of selected sweeteners and their use. Furthermore, a brief overview of analytical methods by which sweeteners can be determined is given. The experimental part focuses on the selection of a suitable chromatographic column for the simple identification of seven sweeteners (aspartame, acesulfame K, mannitol, maltitol, sucralose and xylitol) and the optimization of the mobile phase composition. It was found that it is not possible to determine all sweeteners by one universal method, however, using an Agilent Hi-Plex Ca column (300 x 7.7 mm) and the mobile phase of acetonitrile:water at 7:93 %<sub>v/v</sub>, it was possible to determine the concentration of (maltitol, mannitol, sorbitol, sucralose and xylitol). For the analysis of the individual sweeteners, different sample dilutions had to be used or the composition of the mobile phase had to be slightly changed. The concentration of artificial sweeteners in the chewing gum ranged from 0,35 mg/g (sucralose) to 508 mg/g (xylitol).

## **KEYWORDS**

Sugar substitutes, acesulfame K, aspartame, mannitol, sorbitol, xylitol, sucralose, maltitol, HPLC, ELSD, chewing gums

PROFOUSOVÁ, Sylvie. *Stanovení obsahu náhradních sladidel ve žvýkačkách*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139247>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

---

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za vstřícný přístup, odborné vedení, věnovaný čas a cenné rady. Zároveň bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu v průběhu celé doby studia.

# OBSAH

1 ÚVOD.....	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Sacharidy .....	8
2.1.1 Funkce sacharidů.....	8
2.1.2 Monosacharidy.....	8
2.1.2.1 Glukóza .....	8
2.1.2.2 Fruktóza .....	9
2.1.3 Oligosacharidy .....	10
2.1.3.1 Laktóza.....	10
2.1.3.2 Maltóza .....	10
2.1.3.3 Sacharóza .....	11
2.1.4 Vliv cukrů na zdraví.....	11
2.1.4.1 Diabetes mellitus.....	12
2.1.4.2 Obezita .....	12
2.1.4.3 Zubní kaz .....	12
2.2 Náhradní sladidla.....	13
2.2.1 Rozdělení náhradních sladidel .....	13
2.2.2 Legislativa.....	14
2.2.3 Vliv sladidel na lidské zdraví.....	14
2.2.4 Acesulfam K .....	15
2.2.4.1 Zdravotní nezávadnost acesulfamu K.....	15
2.2.4.2 Využití acesulfamu K .....	15
2.2.5 Aspartam .....	16
2.2.5.1 Zdravotní nezávadnost aspartamu .....	16
2.2.5.2 Využití aspartamu .....	17
2.2.6 Mannitol.....	17
2.2.6.1 Zdravotní nezávadnost mannitolu.....	17
2.2.6.2 Využití mannitolu .....	17
2.2.7 Maltitol.....	18
2.2.7.1 Zdravotní nezávadnost maltitolu.....	18
2.2.7.2 Využití maltitolu .....	19
2.2.8 Sorbitol.....	19
2.2.8.1 Zdravotní nezávadnost sorbitolu.....	19
2.2.8.2 Využití sorbitolu .....	20
2.2.9 Sukralóza.....	20

2.2.9.1	Zdravotní nezávadnost sukralózy .....	20
2.2.9.2	Využití sukralózy .....	21
2.2.10	Xylitol .....	21
2.2.10.1	Zdravotní nezávadnost xylitolu .....	21
2.2.10.2	Využití xylitolu .....	22
2.3	Žvýkačky .....	22
2.4	Metody analýzy náhradních sladidel v potravinách .....	25
2.4.1	Kapalinová chromatografie (LC) .....	25
2.4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	26
2.4.2.1	Princip metody .....	26
2.4.2.2	Mobilní fáze a směšovací zařízení .....	26
2.4.2.3	Čerpadlo .....	26
2.4.2.4	Dávkovací zařízení .....	26
2.4.2.5	Detektory .....	27
2.4.2.6	Kolony .....	28
2.4.2.7	Stanovení sladidel .....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
3.1	Použité chemikálie .....	30
3.1.1	Chemikálie pro mobilní fázi .....	30
3.1.2	Standardy náhradních sladidel .....	30
3.2	Použité laboratorní pomůcky .....	30
3.3	Použité přístroje .....	30
3.4	Použité kolony .....	31
3.5	Popis vzorků .....	31
3.6	Použité pracovní postupy .....	32
3.6.1	Optimalizace metody .....	32
3.6.1.1	Identifikace retenčních časů sladidel pro dané kolony .....	32
3.6.1.2	Optimalizace mobilní fáze .....	32
3.6.2	Příprava vzorků .....	34
3.6.3	Příprava kalibračních roztoků .....	34
4	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	35
4.1	Výběr kolony .....	35
4.1.1	Vliv složení mobilní fáze na separaci vybraných sladidel .....	38
4.2	Stanovení sladidel v reálných vzorcích .....	40
5	ZÁVĚR .....	44
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	45

# 1 ÚVOD

Sladidlo je potravinářská přídatná látka, která napodobuje chuťový účinek cukru. Z tohoto důvodu se sladidla nazývají náhražky cukru. Poptávka po nízkokalorických potravinách vede k růstu používání náhradních sladidel. Tato sladidla se tedy stala velice rozšířenými a celosvětově oblíbenými. Spotřebitelé vyhledávají chuť sladkosti bez přidaných kalorií, čehož lze dosáhnout využitím sladidel, která mají až 13 000krát vyšší sladivost než sacharóza a používají se v menším množství, aby nahradily sladkost mnohem většího množství cukru [1–3]. Vyšší výskyt civilizačních chorob jako je obezita a diabetes mellitus podpořil rozvoj průmyslu náhradních sladidel. Přibývá osob, kteří si kontrolují tělesnou hmotnost, proto se sladidla dnes hojně vyskytují v potravinářských, ale i ve farmaceutických výrobcích a výrobcích osobní hygieny [4, 5]. Mezi typická náhradní sladidla patří acesulfam draselný, aspartam, cyklamát, neotam, sacharin, sukralóza, mannitol, maltitol a další [2].

Snížení množství cukru ve stravě lidí, zejména dětí, je důležitým aspektem v prevenci zubního kazu. Předpokládá se, že používání náhražek cukru částečně přispělo k poklesu výskytu zubního kazu v průmyslových zemích. Jako účinné opatření pro kontrolu zubního kazu lze použít žvýkačky bez cukru, které mohou stimulovat tvorbu slin, čímž zvyšují odbourávání cukrů a dalších fermentovatelných sacharidů ze zubů a ústní dutiny [6, 7].

Stále však existují i rozporuplné údaje z krátkodobé a dlouhodobé konzumace přírodních i umělých sladidel, jako jsou aspartam, sukralóza a deriváty stévie [8]. Nadměrný příjem náhradních sladidel může mít potenciálně nepříznivé účinky na lidské zdraví. Proto je v zájmu ochrany spotřebitelů nutné sledovat a regulovat obsah intenzivních sladidel v různých druzích potravin [2].

K monitorování sladidel byla vyvinuta kapilární elektroforéza a plynová chromatografie, iontová chromatografie a tenkovrstvá chromatografie. Většina z nich je však vhodná pouze pro stanovení jedné složky nebo jednoduchých směsí sladidel kvůli omezením přístrojových detektorů. Často se ale sladidla nacházejí ve směsích pro lepší chuť. Jedním z hlavních problémů při současném stanovení složitých směsí sladidel je skutečnost, že různé analyty se výrazně liší ve fyzikálně-chemických, elektrochemických a spektrálních vlastnostech. Proto se očekává rozšíření detekčních rozsahů spojením s multifunkčními detektory. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s různými detektory, včetně ultrafialového záření (UV), odpařovacího detektoru rozptylu světla (ELSD) a hmotnostní spektrometrie (MS), se široce používá při analýze směsí vícenásobných sladidel [2].

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout jednoduchou univerzální metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie vhodnou pro současné stanovení více náhradních sladidel, která byla aplikována na analýzu vzorků žvýkaček.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Sacharidy

Název sacharidy definuje polyhydroxysloučeniny, které obsahují v molekule karbonylovou skupinu – aldehydovou nebo ketonovou [9]. Sacharidy jsou základními složkami všech živých organismů, zároveň biologicky aktivními molekulami a nejvíce zastoupenými organickými molekulami v biosféře. Společně s bílkovinami a tuky patří sacharidy mezi základní živiny heterotrofních organismů. V organismech plní převážně funkci strukturní a metabolickou [10].

Sacharidy jsou velmi reaktivní složky potravin. Současně mezi četné a nejvýznamnější reakce sacharidů, které probíhají při uchovávání a zpracování potravin, patří reakce s aminosloučeninami. Reakce se obvykle nazývá Maillardova reakce. Těmito reakcemi se získávají žluté, hnědé až černé pigmenty a aromatické látky mnoha potravin [11].

Sacharidy se sladkou chutí, monosacharidy a oligosacharidy (nikoli polysacharidy), lze nazvat jako cukry. Jedná se o bílé krystalické látky rozpustné ve vodě. Za nejběžnější cukr se označuje sacharóza [9, 11].

#### 2.1.1 Funkce sacharidů

Sacharidy se vyskytují ve všech organismech, kde mají několik různých významných funkcí.

Bývají základními stavebními jednotkami strukturních molekul (chitinu, celulózy, hemicelulózy, pektinu, kyseliny hyaluronové atd.) nebo jsou součástí jejich struktury (stavební glykoproteiny, proteoglykany pojivové tkáně, glykolipidy biologických membrán) [9].

Poskytují pohotovou (ve srovnání s lipidy) energetickou zásobu organismů (škrob, glykogen, sacharóza, glukóza) potřebnou pro další biochemické a biologické pochody. Odhaduje se, že sacharidy zajišťují přibližně 75 % příjmu energie pomocí polysacharidů a 25 % oligosacharidy s monosacharidy. Velmi pohotovým zdrojem energie je glukosa [9, 10].

Jsou součástí (deoxy)ribonukleotidů, které se podílejí na struktuře informačních molekul (DNA, RNA) a uplatňují se i u dalších látek (ATP, dalších kofaktorů enzymů) [9].

#### 2.1.2 Monosacharidy

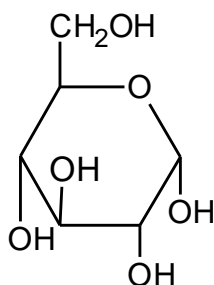
Monosacharidy náleží mezi základní sacharidy, které nelze hydrolyzovat na jednodušší (bez rozštěpení vazby C-C). Oligosacharidy obsahující dvě až deset monosacharidových podjednotek a polysacharidy s řádově stovkami až tisíci monosacharidovými jednotkami mohou vznikat spojováním glykosidovými vazbami. Podle počtu uhlíků (3 až 7) v řetězci se rozpoznávají významné monosacharidy triosy, tetrosy, pentosy, hexosy a heptosy. Dále se klasifikují dle charakteru karbonylových skupin na aldosa a ketosa. V potravinách se obvykle nachází lineární uhlíkový řetězec monosacharidů, ale vyskytují se však i monosacharidy s rozvětveným uhlíkovým řetězcem [9–11].

##### 2.1.2.1 Glukóza

Glukóza je označována jako dextróza, hroznový cukr nebo krevní cukr a patří do skupiny aldohexos [9]. Jedná se o bílou krystalickou látku snadno rozpustnou ve vodě, méně sladkou než sacharóza [12]. Je to jedna z nejzastoupenějších sloučenin na Zemi; vzniká v rostlinách procesy navazujících na fotosyntézu a jedná se o výchozí látku pro biosyntézu dalších sacharidů.

Volná glukóza se nalézá jak v říši rostlinné, tak živočišné [9]. Je obsažena v ovoci, medu, rostlinných šťávách, krvi, lymfě apod. Glukóza je základním zdrojem energie v těle savců [9, 13]. Vyskytuje se i vázaná jako základ mnoha oligosacharidů (zejména disacharidů maltózy, sacharózy, laktózy), polysacharidů (škrobu, celulózy, glykogenu) i heteroglykosidů. Vyrábí se ze škrobu (především bramborového) kyselou nebo enzymovou hydrolýzou škrobu, polysacharid se štěpí přes dextrin, maltózu až na glukózu [9, 12].

Využití nachází především v potravinářském průmyslu. Ke slazení nápojů a dalších potravinářských výrobků se využívá tzv. fruktózový sirup složený ze směsi glukózy a fruktózy s obsahem fruktózy mezi 42 a 55 %, k jehož výrobě se využívá přeměna glukózy na mnohem sladší fruktózu enzymem glukosaisomerasa. Za přítomnosti mikroorganismů podléhá glukóza kvasným (fermentačním) procesům, z nichž nejvýznamnější je přeměna na ethanol a na mléčnou kyselinu. Řízenou fermentací z ní lze vyrábět butan-1-ol, aceton, glycerol nebo citrónovou kyselinu [9].



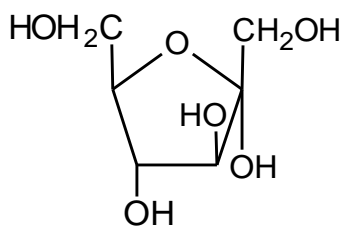
*Obrázek 1: Strukturální vzorec glukózy*

### 2.1.2.2 Fruktóza

Fruktóza, známá jako ovocný cukr, je velice rozšířený monosacharid klasifikovaný jako ketohexosa a také nejsladší přírodní cukr, výrazně sladší než glukóza [9, 12]. Stejně jako všechny významné monosacharidy existuje v přírodě téměř výhradně v konfiguraci D; otáčí však rovinu polarizovaného světla vlevo, proto je nazývána levulóza [9].

V přírodě se obvykle nevyskytuje ve formě volných molekul, ale jako součást disacharidů (fruktóza v sacharóze) a polysacharidů (např. fruktóza v inulinu) [14]. Přirozeně je obsažena v řadě potravin, jako je ovoce, zelenina, med a v přidané formě v potravinách označených jako dietní nebo light, nápojích a nektarech [9, 12, 15]. Příjem tohoto monosacharidu se v posledních letech značně zvýšil, zejména ve formě kukuřičného sirupu nebo kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktózy, který dodává vysokou sladivost široké škále zpracovaných potravin a používá se především jako sladidlo nahrazující sacharózu a/nebo glukózu díky své intenzivní sladké chuti a nízkému glykemickému indexu [15].

Produkt známý jako med je extrémně koncentrovaný viskózní roztok složený z cukrů (cca 80 %), vody (cca 17 %) a "ostatních" složek (cca 3 %). Hlavními cukry v medu jsou obvykle fruktóza a glukóza, ve velmi malém množství jsou přítomny i další mono-, di- nebo oligosacharidy, např. sacharóza, maltóza, isomaltóza, nigeróza, turanóza a maltulóza [16].



**Obrázek 2:** *Strukturní vzorec fruktózy*

### 2.1.3 Oligosacharidy

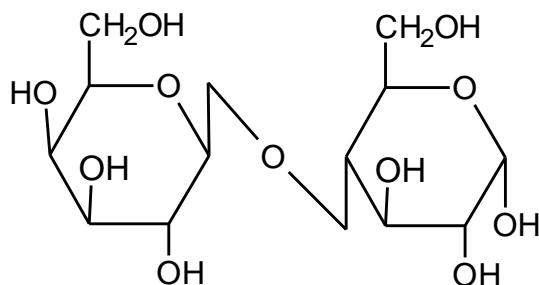
Oligosacharidy jsou sacharidy složené ze dvou nebo více vzájemně vázaných monosacharidových podjednotek pomocí glykosidické vazby [12, 17].

Rozlišujeme sacharidy redukující a neredukující. Pokud mají volnou poloacetalovou hydroxylovou skupinu, mohou za zvýšené teploty v alkalickém prostředí redukovat měďnaté nebo stříbrné ionty, proto jsou označovány jako redukující sacharidy, do této skupiny jsou zařazeny volné monosacharidy a mnohé oligosacharidy (maltóza, laktóza). Jestliže volnou poloacetalovou skupinu nemá, protože při vzniku glykosidické vazby reagovaly dvě poloacetalové skupiny, poté se jedná o neredukující sacharidy (sacharóza) [9, 12].

Potraviny (ovoce, zelenina, mléko, med) obsahují velké množství volných nebo vázaných oligosacharidů. Jsou složeny především z glukózy, fruktózy, galaktózy a maltózy v různých kombinacích. Nejvýznamnějšími disacharidy jsou maltóza, sacharóza a laktóza [12].

#### 2.1.3.1 Laktóza

Laktóza ( $\beta$ -D-galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukóza), zvaná mléčný cukr, je redukující disacharid obsažený v mléce savců [9, 12, 17]. Je složena z galaktózy a glukózy a nachází se především v mléčných výrobcích, kde se její obsah značně liší [18, 19]. Potraviny upravované fermentativním mléčným kvašením (jogurt, acidofilní mléko, kefir, sýry) mohou obsahovat snížený obsah laktózy [12, 18]. V trávicím traktu je požitá laktóza hydrolyzována enzymem laktázou ( $\beta$ -galaktosidázou) [9, 19]. Pokud je aktivita laktázy nízká nebo chybí, může nestrávená laktóza vyvolat příznaky laktózové intolerance, mezi které patří bolesti břicha, nadýmání střev, průjem atd. [19]. Komerčně laktóza nachází využití ve farmaceutickém průmyslu, kojenecké výživě a v krmivech pro zvířata [18].

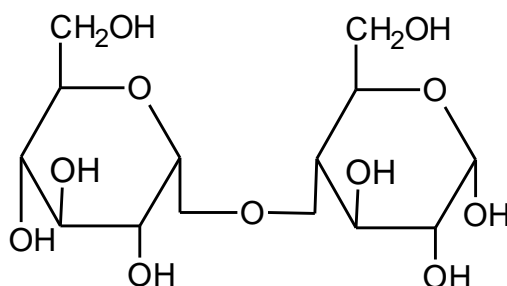


**Obrázek 3:** *Strukturní vzorec laktózy*

#### 2.1.3.2 Maltóza

Maltóza ( $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glukosa), též sladový cukr, je disacharid tvořený dvěma molekulami glukózy [9, 13]. Je základní stavební jednotkou škrobu a glykogenu. Vzniká enzymovou hydrolyzou škrobu [9].

Nachází se v klíčovém semenech (v klíčovém ječmeni a sladu) a při výrobě piva tvoří podstatnou část mladiny [9, 12]. Maltóza se vyznačuje charakteristickou chutí [12]. Je podstatně méně sladší než glukóza při stejné výživové hodnotě. Uplatňuje se jako výživný přídatek v potravinářském a farmaceutickém průmyslu [9]. V poměrně velkém procentuálním zastoupení je maltóza obsažena i v medu [12].

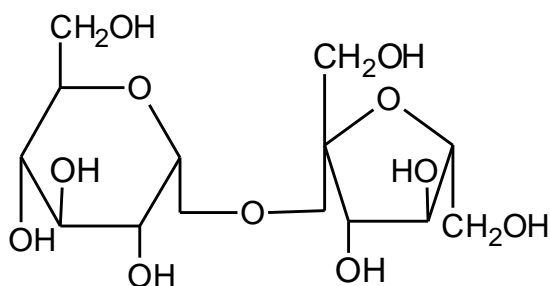


**Obrázek 4:** *Strukturní vzorec maltózy*

### 2.1.3.3 Sacharóza

Sacharóza ( $\beta$ -D-fruktofuranosyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid), známá též jako řepný nebo třtinový cukr. Jedná se o nejvýznamnější neredukující disacharid. Je složená ze stejných dílů molekul glukózy a fruktózy. Nejběžnější využití sacharózy je v potravinářství jako univerzální sladidlo [9, 13]. Je také surovinou pro výrobu např. invertního cukru, který vzniká kyselou či enzymovou hydrolyzou sacharózy, tzv. inverzí. Jedná se o ekvimolární směs D-glukózy a D-fruktózy. Invertní cukr je používán hlavně jako sladidlo, obvykle ve formě sirupu, jenž má relativní sladivost 95–105 % sladkosti sacharózy [11, 17]. Je obsažen v medu a dle poměru glukózy a fruktózy je dána jeho sladivost a tuhost [12].

Sacharóza je velmi rozšířeným cukrem vyskytujícím se zejména v rostlinách. Je například přirozeně přítomna v ovoci. V průmyslu se nejčastěji získává rafinací z cukrové třtiny nebo cukrové řepy. Sacharóza může být využívána mikroorganismy jako živina, avšak ve zvýšených koncentracích dochází k inhibici jejich růstu. Z tohoto důvodu je využívána jako konzervační činidlo (do marmelád, kompotů apod.) [6, 9, 11].



**Obrázek 5:** *Strukturní vzorec sacharózy*

### 2.1.4 Vliv cukrů na zdraví

Cukr je od nepaměti jednou z hlavních složek lidské stravy. V důsledku vysokého výskytu civilizačních chorob v posledních desetiletí se zvyšuje podezření, že cukr negativně ovlivňuje lidské zdraví [20].

Dle vyskytujících se názorů odborníků, zvýšený příjem potravin s přidaným cukrem může být odpovědný za rychlý nárůst obezity, diabetes mellitus, zubního kazu, hyperaktivity, metabolického syndromu a kardiovaskulárního onemocnění. Z důvodu jejich vlivu na veřejné zdraví bylo zajímavým řešením nahradit cukr alternativními sladidly [8, 20].

Podle doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organisation) by volné cukry (mono- a disacharidy v potravinách, v medu a v ovocných džusech) neměly převýšit 10 % celkového energetického příjmu. V České republice se doporučuje přijímat jednu až tři čajové lžičky (méně než 15 g) cukru denně [20].

#### **2.1.4.1 Diabetes mellitus**

Příznaky diabetu jsou způsobeny nedostatkem inzulínu, který je důsledkem buď snížené produkce inzulínu, nebo sníženého účinku inzulínu na buněčné úrovni. Nejrozšířenější formou diabetu je diabetes mellitus nezávislý na inzulínu. Začíná nejčastěji v dospělosti a je spojen s obezitou [21].

Primárním cílem léčby diabetu je dnes kontrola hladiny glukózy v krvi. Spotřebitelé by se měli řídit dietním doporučením [1]. Ve stravě pro diabetes jsou zahrnuty potraviny s vysokým obsahem sacharidů, s důrazem na ovoce, zeleninu a celozrnné produkty. Tyto potraviny jsou doporučovány kvůli pomalému uvolňování glukózy, což snižuje metabolické nároky na inzulín. Diabetické asociace doporučují pro osoby s diabetem nižší příjem cukrů než u běžné populace [21]. Potravinářský průmysl může tedy významně přispět s poskytováním upravených potravinářských výrobků. To vedlo k objevení několika forem alternativních intenzivních sladidel, které umožnily nabídnout spotřebiteli sladkou chuť bez kalorií [1].

Účinky sacharidových potravin na hladinu glukózy v krvi lze porovnat pomocí glykemického indexu, což je standardizovaná míra celkového zvýšení hladiny glukózy v krvi nad výchozí hodnotu během dvou hodin po konzumaci 50 g sacharidové potraviny [21]. Glykemický index se vyjadřuje na glukózové stupnici, kdy glukóza má hodnotu 100 nebo ve stupnici s bílým chlebem, který má hodnotu 100. Hodnota glykemického indexu sacharózy je 68 a fruktózy 30 [22].

Za potraviny s vysokým glykemickým indexem se považují potraviny se sacharidy, které jsou tráveny, absorbovány a rychle metabolizovány ( $GI \geq 70$  na glukózové stupnici). Zatímco ty, které jsou tráveny, absorbovány a metabolizovány pomalu, jsou považovány za potraviny s nízkým glykemickým indexem ( $GI \leq 55$  na glukózové stupnici) [22].

#### **2.1.4.2 Obezita**

Přebytečný tělesný tuk vzniká z energetické nerovnováhy způsobené tím, že jíme příliš mnoho kalorií a využijeme jen málo z nich. Možná proto, že cukr přidává hodnotu mnoha jídlům a nápojům, byla vyslovena hypotéza, že cukr hraje klíčovou roli v rozšíření vzniku obezity [21].

#### **2.1.4.3 Zubní kaz**

Zubní kaz je celosvětově jedním z největších zdravotních problémů. Nadměrný příjem cukru a jiných fermentovatelných sacharidů je hlavním příčinným faktorem vzniku a progresu zubního kazu [7, 23]. Optimální pH ústní dutiny je 6,7 až 7,2, prahovou hodnotou pro vznik zubního kazu je pH 5,5 a k erozi dentinu dochází při pH 6,0. Zubní kaz se vyskytuje v dutině ústní, kde se nachází i cukr.

Po konzumaci cukru však může pH v zubním plaku rychle klesnout na  $< 5,0$  v důsledku produkce organických kyselin (mléčné, octové a propionové) bakteriálním metabolismem [8, 23]. Procento úbytku materiálu zubu při erozi skloviny a dentinu se zvyšuje s dobou expozice a frekvencí konzumace [23].

Zubní kaz je ale ovlivněn i mnoha dalšími faktory, jako například nedostatečná pozornost věnována péči o ústní hygienu, dodáváním fluoridů, bakteriálními složkami plaku, množstvím a složením slin, typem preventivní péče a imunologickou odpovědí jedince [21].

## **2.2 Náhradní sladidla**

Sladidlo je potravinářská přídatná látka v potravinách, která napodobuje chuťový účinek cukru a používá se k úpravě sladkosti. Náhradní sladidla jsou syntetické nebo polysyntetické organické sloučeniny získané chemickou syntézou, které se staly celosvětově populární a výsledkem je široké využití v potravinách, nápojích, farmaceutických výrobcích a výrobcích osobní hygieny jako náhražka stolního cukru [1, 2, 4]. Sladidla jsou běžně používány v potravinářském průmyslu samostatně nebo v kombinaci ke sladění cukrovinek, žvýkaček a džemů [24].

Aby byla látka přijatelným sladidlem komerčního využití musí mít dostatečnou sladící schopnost s příjemnou chutí za rozumnou cenu. Nebýt karcinogenní a mutagenní. Být termostabilní (tj. odolat teplotám varu). Mít nízký počet nebo žádné kalorie [6].

V současné době hrají v potravinářském průmyslu zásadní roli náhradní sladidla, jako je například acesulfam draselný, aspartam, cyklamát, neotam, sacharin a sukralóza, jejichž sladící síla je asi 30 až 13 000krát vyšší než u sacharózy, běžně používaného cukru. Většina sladidel má požadovanou sladkost, a jelikož nemůžou být v lidském těle metabolizovány, neposkytují žádné nebo jen malé množství kalorií v potravinách, jsou tedy označovány jako cukry s nulovým obsahem kalorií. Proto jsou prospěšné při kontrole tělesné hmotnosti a hladiny inzulínu. Protože nekalorická sladidla jsou obecně mnohem sladší než sacharóza, lze je tedy použít v malém množství k nahrazení sladkosti mnohem vyššího množství cukru [1, 2, 4, 8].

Podle právních předpisů Evropské unie (EU) jsou všechny potravinářské přídatné látky označeny číslem E a musí být vždy uvedeny na obalu v seznamu složek. Všechny potravinářské přídatné látky musí být před svým použitím schváleny zvláštními právními předpisy, jako jsou předpisy EU a Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (FDA, U.S. Food and Drug Administration) [5].

### **2.2.1 Rozdělení náhradních sladidel**

Sladidla se dělí na intenzivní a objemová. Vysoce intenzivní sladidla mají sladkou chuť, ale jsou nekalorická, v podstatě neposkytují potravinám žádný objem, mají větší sladivost než cukr, a proto se používají ve velmi nízkých dávkách [25]. Intenzivní sladidla se dělí na semisyntetická, syntetická, včetně aspartamu, sacharinu a sukralózy; a na přírodní extrahovaná z rostlin, jako jsou steviol glykosidy, thaumatín a monellín. Mnoho spotřebitelů však preferuje výrobky s přírodními sladidly [8, 25]. Naproti tomu objemová sladidla jsou obvykle sacharidy, které dodávají potravinám energii (kalorie) a objem [25]. Mají podobnou sladivost jako cukr a používají se ve srovnatelném množství. Nejpopulárnějšími objemovými sladidly jsou erythritol, sorbitol, xylitol, maltitol, isomalt, laktitol a mannitol [26].

Další způsob, jak klasifikovat sladidla, je podle doby, kdy byly objeveny. Sacharin, cyklamát a aspartam, které byly nejdříve známými sladidly, se označují jako „sladidla první generace“. Mezi novější sladidla se řadí acesulfam-K, sukralóza, alitam a neotam, jsou kategorizována jako sladidla druhé generace [6].

Větší skupinou náhradních sladidel jsou cukerné alkoholy (polyoly), což jsou málo stravitelné sacharidy, které se získávají záměnou aldehydové skupiny za hydroxylovou. Protože většina cukerných alkoholů vzniká z odpovídajících aldózových cukrů, nazývají se také alditoly. Mezi cukerné alkoholy lze zařadit hydrogenované monosacharidy (sorbitol, mannitol), hydrogenované disacharidy (isomalt, maltitol, laktitol) a směsi hydrogenovaných mono-, di- a/nebo oligosacharidů (hydrogenované škrobové hydrolyzáty) [5].

### **2.2.2 Legislativa**

Při výrobě potravin lze používat pouze přídatné látky, které byly schváleny postupem podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1331/2008, které stanovuje jednotný postup pro posuzování a povolování potravinářských přídatných látek, potravinářských enzymů a potravinářských aromat a které jsou uvedeny na seznamech schválených potravinářských přídatných látek Unie v příloze II a v příloze III nařízení (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách. Nařízení (ES) č. 1333/2008 stanovuje pravidla pro potravinářské přídatné látky, podmínky použití potravinářských přídatných látek v potravinách, v potravinářských přídatných látkách, v potravinářských enzymech a v potravinářských aromatech a pravidla pro označování potravinářských přídatných látek prodávaných jako takové [27, 28].

Seznamy potravinářských přídatných látek Unie schválených pro použití v potravinách a podmínky použití byly přijaty nařízením (EU) č. 1129/2011, kterým se mění příloha II nařízení evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie a nařízením (EU) č. 1130/2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídatných látkách zavedením seznamu potravinářských přídatných látek Unie schválených pro použití v potravinářských přídatných látkách, potravinářských enzymech, potravinářských aromatech a živinách [27].

V České republice stanovuje vyhláška č. 4/2008 Sb. druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. V příloze č. 5 vyhlášky je uveden seznam povolených sladidel při výrobě potravin a skupin potravin a podmínky jejich použití. Vyhláška č. 4/2008 Sb. byla zrušena vyhláškou č. 253/2018 Sb., která pojednává o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin [29, 30].

### **2.2.3 Vliv sladidel na lidské zdraví**

Potravinářský průmysl i spotřebitelé přidávají náhradní sladidla do svých potravin a nápojů, protože chtějí sladkou chuť bez přidaných kalorií [1, 24]. Pokud jde o celkové zdraví jsou náhražky cukru obzvláště prospěšnou pomůckou k udržení sníženého energetického příjmu a tělesné hmotnosti a ke snížení rizika diabetes typu 2 a kardiovaskulárních onemocnění ve srovnání s cukry [6].

Navzdory skutečnosti, že doposud provedené studie uvádějí dostatek výhod, několik údajů se týká nežádoucích účinků u spotřebitelů [8]. Nadměrný příjem náhradních sladidel může mít za následek potenciálně nepříznivé účinky na lidské zdraví.

V důsledku toho je v zájmu ochrany spotřebitelů důležité sledovat obsah intenzivních sladidel v různých druzích potravin [2]. Pro použití a dávkování jednotlivých sladidel v potravinách a nápojích jsou stanoveny hodnoty ADI (přijatelná denní dávka), které byly přiřazeny po přezkoumání jejich studií hodnocení bezpečnosti. ADI udává, jaké maximální množství sladidla v miligramech lze za den přijmout na kilogram tělesné hmotnosti, aniž by znamenalo zdravotní riziko [8].

V předklinických a klinických studiích bylo prokázáno, že sladidla mohou mít negativní účinky na složení střevní mikrobioty, kontrolu chuti k jídlu a metabolismus glukózy [8].

Snížení množství cukru ve stravě lidí, zejména dětí, je důležitým faktorem při prevenci zubního kazu. Předpokládá se, že používání náhražek sacharózy v cukrovinkách by částečně přispělo k poklesu prevalence zubního kazu v průmyslových zemích, že by mohly hrát důležitou roli při posunu procesu kazu ve prospěch zachování zdraví zubů a měly by být doporučovány jako součást celkové preventivní léčby u pacientů s vysokým rizikem vzniku zubního kazu. Ačkoliv mají antikariogenní vlastnosti, není dostatek důkazů k tomu, abychom je mohli doporučit jako strategii první volby [6].

#### **2.2.4 Acesulfam K**

Acesulfam draselný (K) je bílý krystalický prášek a zvýrazňovač chuti, který je přibližně 200krát sladší než sacharóza a má vysokou rozpustnost ve vodě [1]. Přijatelná denní dávka pro acesulfam K (ADI) je doporučena 9–15 mg/kg [13, 31]. Toto sladidlo je stabilní při vysokých teplotách a i při různých podmínkách vyskytujících se v nealkoholických nápojích a potravinách [8, 31]. Zanechává jemně nahořklou pachut', která bývá potlačena smícháním s jinými sladidly v poměru 1:1. Má schopnost zvýrazňovat sladivost dalších náhradních sladidel [13]. V lidském těle není metabolizován a je vylučován močí, tím pádem neposkytuje žádné kalorie a navzdory obsahu draslíku neovlivňuje příjem draslíku [6, 9].

##### **2.2.4.1 Zdravotní nezávadnost acesulfamu K**

V roce 1988 FDA schválila použití acesulfamu K v různých suchých potravinářských výrobcích včetně žvýkaček, instantního čaje, kávy a v alkoholických nápojích [1, 6]. Následně v roce 2003 agentura schválila jeho použití jako univerzálního sladidla. Jedním z rozkladných produktů acesulfamu K je acetoacetamid, o němž je známo, že je toxický, pokud je konzumován ve velmi velkých dávkách, protože expozice člověka tomuto rozkladnému produktu by byla zanedbatelná. FDA dospěl k závěru, že jeho další testování není nutné [1]. Nejistily se žádné prokazatelné důkazy o karcinogenitě, mutagenitě nebo toxicitě [6]. I vědecký výbor pro potraviny Evropské komise podpořil jeho bezpečnost, ale doporučil přijatelnou denní dávku [31].

##### **2.2.4.2 Využití acesulfamu K**

Acesulfam K je tepelně stabilní, takže ho lze použít při vaření a pečení. Pokud se používá samostatně ke slazení potravin nebo nápojů, je množství velmi malé vzhledem k jeho intenzivní sladící schopnosti a také proto, že se často používá v kombinaci s jinými sladidly z důvodu jeho zanechávání hořké pachutě [1, 32]. Acesulfam K se obvykle mísí se sukralózou nebo aspartamem, přičemž každé sladidlo maskuje chuť druhého a vykazuje synergické efekty, díky nimž je směs sladší než jeho složky [1].

Jedná se o univerzální sladidlo, které se používá v pečivu, cukrovinkách, žvýkačkách, dezertech, dietních nápojích, želatinách, pudincích [32]. Používá se také v zubních pastách, ústních vodách a farmaceutických přípravcích [20].

### **2.2.5 Aspartam**

Jedná se o umělé nesacharidové sladidlo, které je metylesterem dipeptidu aminokyselin kyseliny asparagové a fenylylalaninu [1]. Je označován za první sladidlo s vysokou sladivou účinností a široce přijatelným chuťovým profilem [33]. Ačkoli aspartam poskytuje energii odpovídající 4 kcal/g (jako sacharóza), jeho vysoká sladivost (asi 200krát vyšší než u sacharózy) však vede k tomu, že se obvykle používá ve velmi nízké koncentraci, a proto množství používané při přípravě dietních a nízkokalorických potravin je tak malé, že jeho kalorický příjem je nepodstatný [1, 8, 33]. Přijatelná denní dávka (ADI) je doporučena 50 mg/kg [34]. Aspartam je tepelně nestabilní při delším zahřívání, při kterém ztrácí sladivost, proto jej nelze používat při pečení nebo vaření [1, 34]. Je mírně rozpustný ve vodě (asi 3 g na 100 ml, pH 3 při pokojové teplotě). Rozpustnost se zvyšuje s vyšším nebo nižším pH a také se zvýšenou teplotou. Ve vodném roztoku je vztah mezi pH a stabilitou aspartamu zvonovitá křivka s maximem stability při pH 4,3 [1].

Po požití se aspartam rozkládá na přirozené zbytkové složky, včetně kyseliny asparagové, fenylylalaninu, methanolu a dalších rozkladných produktů včetně formaldehydu, kyseliny mravenčí a diketopiperazinu. Každý z nich se pak metabolizuje stejně, jako kdyby pocházel z jiných potravinových zdrojů (maso, mléko, zelenina a ovoce). Jeho konzumování v běžné stravě je tak bezpečné [1, 20].

#### **2.2.5.1 Zdravotní nezávadnost aspartamu**

Úřad FDA schválil aspartam jako první sladidlo v roce 1981 pro použití za určitých podmínek jako stolní sladidlo, do žvýkaček, studených snídaňových cereálií a suchých základů některých potravin [6, 34]. V roce 1983 FDA povolil použití aspartamu v sycených nápojích a sypkých sirupových bázích a v roce 1996 jej schválil jako "sladidlo pro všeobecné použití" [34].

Vědci z FDA přezkoumali vědecké údaje týkající se bezpečnosti aspartamu v potravinách a dospěli k závěru, že za určitých podmínek je pro běžnou populaci bezpečný [34]. Pro osoby se vzácným dědičným onemocněním známým jako fenylylketonurie (PKU) představuje fenylylalanin zdravotní riziko, protože ho obtížně metabolizují. Protože je i součástí aspartamu, měli by tyto osoby kontrolovat jeho příjem nejen v něm ale i ze všech zdrojů. Na etiketách potravin a nápojů obsahujících aspartam musí být uvedeno prohlášení, které informuje osoby s PKU, že výrobek obsahuje fenylylalanin [1, 34].

Na základě přezkoumání vládních výzkumů a doporučení poradních orgánů, jako je Vědecký výbor pro potraviny Evropské komise a společný Výbor odborníků organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) a WHO pro potravinářské přídatné látky, byl aspartam ve více než devadesáti zemích světa shledán bezpečným pro lidskou spotřebu [1, 6]. Navzdory některým nevědeckým předpokladům neexistují žádné důkazy o tom, že by aspartam byl karcinogenní. Jedná se také o nekariogenní sladidlo [6].

### **2.2.5.2 Využití aspartamu**

Aspartam se používá především ke slazení různých nízkokalorických potravin a nealkoholických nápojů, včetně nízkokalorického stolního sladidla. Také je používán k přípravě žvýkaček, jogurtů, cukrovinek, snídaňových cereálií, želé, pudinků, instantní kávy, čaje a farmaceutických výrobků [1, 6, 8].

### **2.2.6 Mannitol**

Mannitol spadá mezi méně používané alkoholové cukry [13, 33]. Využití cukerných alkoholů spočívá v jejich schopnosti maskovat hořké nepříjemné chutě jiných nízkokalorických sladidel [33]. Mannitol, izomer sorbitolu, je asi o 50 % sladší než sacharóza a na rozdíl od sorbitolu je stabilní vůči vlhkosti, má velmi nízkou hygroskopičnost. Je komerčně dostupný v různých formách bílého krystalického prášku a granulí, které jsou rozpustné ve vodě [35]. Poskytuje přibližně poloviční kalorickou hodnotu (~2 kcal/g) a má zanedbatelný chladivý účinek [33, 36]. Denní limit pro mannitol není specifikován [37]. Při použití jako složka potravin mannitol zvyšuje hladinu glukózy v krvi v menší míře než sacharóza, má tedy relativně nízký glykemický index, a proto se používá jako sladidlo pro osoby s cukrovkou a do žvýkaček [36].

Mannitol se používá v lékařství a potravinářství a komerčně se vyrábí chemickou hydrogenací fruktózy nebo extrakcí z mořských řas. Přirozeně se vyskytuje v mnoha rostlinách, řasách, houbách a bakteriích. Hraje roli při skladování energie, fermentaci, odstraňování reaktivních forem kyslíku, osmoregulaci a obraně proti patogenům [38].

#### **2.2.6.1 Zdravotní nezávadnost mannitolu**

Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (FDA) považuje cukerné alkoholy, mezi které patří mannitol, za "obecně uznávané jako bezpečné (GRAS)" nebo schválené potravinářské přídatné látky. Mannitol (E421) je zahrnut v Evropském seznamu potravinářských přídatných látek. Při konzumaci nadměrného množství mohou cukerné alkoholy způsobit průjem, kdy se nevstřebané množství cukerných alkoholů dostává do tlustého střeva, kde na sebe váže vodu a podléhá fermentaci, což má za následek projímavý efekt, plynatost a průjem. Proto je u všech potravin obsahujících více než 10 % přidaných polyolů vyžadováno projímavé varování [39].

Mannitol nelze v lidském žaludku strávit, ale může pronikat do krevního oběhu a nasávat vodu do kapilár, což vede k rozšíření krevních kapilár a snížení krevního tlaku. Jako potravinářská přísada má mannitol dobré diuretické vlastnosti [36].

#### **2.2.6.2 Využití mannitolu**

Uplatňuje se v medicínské praxi i jako sladidlo [13]. Je velmi užitečný jako potah tvrdých bonbonů, sušeného ovoce a žvýkaček [36]. Používá se také ke slazení žvýkaček, mátových bonbónů a pastilek k „osvěžení dechu“, neboť se rozpouštěním mannitolu odčerpává teplo, a tak chladivý efekt dodává pocit svěžesti. Při dávkách vyšších než 20 g má projímavé účinky, a proto se někdy aplikuje jako projímadlo pro děti [13, 36].

### 2.2.7 Maltitol

Maltitol je disacharidový polyol, který se skládá ze stejného podílu glukózy a sorbitolu a získává se ze škrobu hydrogenací maltózy nebo glukózového sirupu s velmi vysokým obsahem maltózy [6]. Maltitol se vyznačuje vlastnostmi, které se nejvíce podobají vlastnostem sacharózy. Jeho sladkost je čistá a příjemná, dosahuje až 90 % sladivosti připisované sacharóze, ale jeho kalorická hodnota činí 2,1–2,4 kcal/g [5, 39]. Přijatelná denní dávka (ADI) pro maltitol není specifikována [40]. Nízká kalorická hodnota je však kombinována s nejvyšším glykemickým indexem ze všech cukerných alkoholů, tj. 35 % ve srovnání s glukózou, ale stále jen polovičním ve srovnání se sacharózou [5, 39]. Ze všech polyolů má maltitol křivku rozpustnosti nejbližší křivce rozpustnosti sacharózy a je volně rozpustný ve vodě. Srovnatelná rozpustnost napomáhá tomu, že se maltitol rozpouští v ústech téměř stejně jako sacharóza, takže v ústech je cítit očekávaná sladká chuť daného potravinářského výrobku [5, 41].

Vzhledem k vysoké krystalické čistotě a chemickému složení je maltitol ve své přírodní krystalické formě méně hygroskopický než cukr. To by při zpracování za daných atmosférických/klimatických podmínek znamenalo lepší skladovatelnost zboží vyrobeného z maltitolu než ze sacharózy. Nízká hygroskopičnost maltitolu vede k dlouhotrvající křupavosti, pokud se používá jako potah na cukrovinky a žvýkačky. Při zahřívání nereaguje s aminokyselinami, což zabraňuje Maillardovým reakcím, a tím snižuje potenciál nadměrného hnědnutí [41]. Nepodléhá ani procesu karamelizace a jeho chladivý účinek je ve srovnání s jinými polyoly zanedbatelný [33, 41].

Maltitol se přirozeně vyskytuje v různých druzích ovoce a zeleniny. Malá množství maltitolu se přirozeně vyskytují v praženém sladu a listech čekanky. Komerčně se vyrábí ze škrobu obilovin, jako je kukuřice, pšenice a brambory [41].

#### 2.2.7.1 Zdravotní nezávadnost maltitolu

Podle hodnocení Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) a Komise Codex Alimentarius jsou maltitol a další nízkokalorická sladidla bezpečná pro lidskou spotřebu a nezpůsobují rakovinu ani jiné zdravotní problémy, pokud jsou konzumována v přijatelném denním příjmu (ADI). Stejně tak rozsáhlé toxikologické testy, provedené Společným výborem expertů FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA), prokázaly, že maltitolové sirupy jsou pro lidskou spotřebu bezpečné [41].

Obecně lze říct, že většina polyolů, včetně maltitolu představuje pro člověka nízké riziko, ale při nadměrné konzumaci, v množství větším než 25–30 g/kg tělesné hmotnosti denně, má několik nežádoucích účinků, jako jsou projímavost, gastrointestinální příznaky, nadýmání, průjem a bolesti břicha [5, 41]. Proto pokud jakýkoli potravinářský výrobek obsahuje více než 10 % přidaného maltitolu nebo jiných polyolů, musí obsahovat prohlášení "nadměrná konzumace může mít projímavé účinky". Kromě toho může maltitol při dlouhodobém užívání vysokých dávek, zejména v prvním trimestru těhotenství, vyvolat hyperglykémii a snížit hmotnost embrya. Proto je třeba dbát opatrnosti při jeho používání ve vyšších koncentracích v potravinách a nápojích v zájmu zdraví naší generace a generací budoucích [41].

Maltitol je bezpečný i pro diabetiky. Vzhledem k tomu, že fermentuje v tlustém střevě, je rychlost jeho trávení pomalá a není zcela stráven, což znamená pomalejší vzestup hladiny cukru a inzulínu v krvi ve srovnání s glukózou a sacharózou [41].

Jeho používání neusnadňuje vznik zubního kazu, protože nemůže být metabolizován bakteriemi v ústní dutině [39, 41]. A nedávná studie ukázala, že maltitol ve žvýkačkách významně snižuje koncentraci kariogenních druhů bakterií (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus* a *Lactobacillus*) v zubním plaku ve srovnání se žvýkačkovou bází [6].

### **2.2.7.2 Využití maltitolu**

Maltitol má mnohostranné využití jako náhražka cukru v potravinářských výrobcích, jako jsou pekařské a mléčné výrobky, čokoláda a sladkosti. Může v potravinách a nápojích působit jako objemové činidlo, zvlhčovač, emulgátor, stabilizátor sladidel nebo zahušťovač. Maltitol je komerčně dostupný jako maltitolový sirup (E965ii) a krystalický maltitol (E965i) a je již obsažen v celé řadě potravin, jako jsou žvýkačky, čokoláda, tabulkové mentolky a další příbuzné výrobky, například tvrdé a žvýkácké bonbony [39, 41]. Celkově sladkosti vyrobené s tímto sladidlem se lépe žvýkají a nejsou tak lepivé. Maltitolový sirup je vynikající pro pektinové želé. Maltitol je také užitečnou náhražkou tuku a cukru v mražených mléčných výrobcích a zmrzlině, protože dodává výrobkům krémovitost, sladkost a lepivost a prodlužuje jejich trvanlivost [41].

Používá se také ve farmaceutických přípravcích nebo v přípravcích pro péči o ústní dutinu (zubní pasty). Jako pomocná látka ve farmaceutických přípravcích se maltitolový sirup používá jako nízkokalorické sladidlo, např. v sirupu proti kašli. Nízká tendence ke krystalizaci a hygroskopické vlastnosti maltitolu z něj dělají zvlhčující a zvláčňující látku, např. v hydratačních přípravcích na pokožku. Používá se také jako změkčovač v želatinových kapslích [39, 41].

### **2.2.8 Sorbitol**

Sorbitol také patří mezi cukerné alkoholy [13]. Dodává v ústech jemný pocit sladké, chladivé a příjemné chuti a vykazuje dobré chuťové vlastnosti. Je asi o 60 % sladší než sacharóza, dodává sladkost, která není dlouhotrvající a má poměrně silné záporné teplo roztoku (-27 kcal/g) [33, 39]. Má nízkou výživovou hodnotu asi 2,6 kcal/g a velmi nízkou glykemickou odezvu, která je pouze 9 % glykemie glukózy [39]. Denní limit pro sorbitol není specifikován [42]. Sorbitol se jako nejhygroskopičtější ze všech cukerných alkoholů používá jako zvlhčující látka, kde tvrdě konkuruje propylenglykolu a glycerinu [39].

Sorbitol se komerčně vyrábí enzymaticky ze škrobu, čímž vzniká kukuřičný sirup s vysokým obsahem dextrózy, který se následně podrobuje katalytické hydrogenaci [39]. V přírodě se nalézá v některých bobulích, jako je jeřáb, hroznové víno nebo další ovoce (třešně, švestky, hrušky, jablka), ale pro tělo je těžko vstřebatelný. Proto může u citlivých lidí způsobit střevní potíže a mít projímavé účinky [13].

#### **2.2.8.1 Zdravotní nezávadnost sorbitolu**

Sorbitol patřící mezi alkoholové cukry FDA považuje za "obecně uznávaný jako bezpečný" nebo za schválený potravinářskou přídatnou látku. Evropský seznam potravinářských přídatných látek zahrnuje i sorbitol (E420) [39]. Vedlejší účinky alkoholových cukrů viz 2.2.6.1 Zdravotní nezávadnost mannitolu.

### 2.2.8.2 Využití sorbitolu

Jedná se o ideální složku dietních potravin, včetně dietních nápojů a zmrzlin, mentolových bonbonů a žvýkaček bez cukru, u kterých se využívá toho, že bakterie sorbitol hůře rozkládají, a tak nezpůsobují vznik zubního kazu [13, 39]. Sorbitol má v potravinářském průmyslu široké využití i jako náhradní sladidlo pro diabetiky [13].

Sorbitol v potravinářských výrobcích plní i další funkce, působí jako kryoprotektant, zvlhčující látka a může chránit před poškozením mrazem a sušením, například při výrobě enzymů nebo citlivých biotechnologických léčiv. Kapalný sorbitol se používá k maskování chuti a jako plnidlo, které dodává tekutým lékovým formám hustotu a viskozitu [33, 39]. Sorbitolové sirupy, které přispívají k vyššímu obsahu vlhkosti, se používají jako stabilizátory vlhkosti a změkčovačla v cukrovinkách [33]. Sorbitol se používá jako prodlužovač trvanlivosti, působí jako modifikátor a inhibitor krystalů, který zabraňuje tvorbě krystalů cukru v sirupech. Sorbitol v prášku vykazuje dobrou lisovatelnost. Používá se jako pojivo nebo objemové činidlo při přímém lisování tablet a také v průmyslových tabletách detergentů, tabáku a kosmetiky. Další využití v kosmetice a ústní hygieně zahrnuje zubní pasty, ústní vody a osvěžovače dechu [39].

### 2.2.9 Sukralóza

Sukralóza se vyrábí selektivní substitucí, kdy tři atomy chloridu nahrazují tři hydroxylové skupiny na molekule sacharózy, což může částečně vysvětlovat, proč sukralóza vykazuje chuťový profil velmi podobný sacharóze [1, 33]. Ačkoli se sukralóza vyrábí z cukru, lidské tělo ji jako cukr nerozpoznává a nemetabolizuje, proto neposkytuje žádné kalorie. Většina požitá sukralózy neopustí trávicí trakt a je přímo vyloučena stolicí, zatímco 11–27 % se jí vstřebá. Množství, které se vstřebá z gastrointestinálního traktu, je z velké části odstraněno z krevního oběhu ledvinami a vyloučeno močí [1].

Sukralóza je asi 600krát sladší než sacharóza a je velmi stabilní vůči široké škále podmínek zpracování. Má příjemnou sladkou chuť a její kvalitativní a časový profil intenzity je velmi blízký profilu sacharózy [1]. Rychle dosahuje vrcholu sladkosti, ale nerozkládá se tak rychle jako sacharóza, což vede k nežádoucí zbytkové sladkosti [33]. Na rozdíl od mnoha jiných vysoce účinných sladidel nemá sukralóza výrazně hořkou pachut', což ji spolu s vysokou stabilitou za nejrůznějších podmínek učinilo oblíbeným sladidlem v mnoha moderních aplikacích, z toho důvodu bývá hojně komerčně doporučována diabetikům [13, 33]. Přijatelný denní příjem (ADI) sukralózy je 5 mg/kg tělesné hmotnosti/den [1]. Sukralóza je velmi dobře rozpustná ve vodě a je stabilní v širokém rozmezí pH a teplot. Jako jednu z mála náhradních sladidel ji lze použít pro tepelnou úpravu pokrmů a při pečení [1, 13]. Při skladování za vysokých teplot uvolňuje HCl a vytváří určitý druh zbarvení [1].

#### 2.2.9.1 Zdravotní nezávadnost sukralózy

Úřad FDA schválil sukralózu pro použití v 15 kategoriích potravin v roce 1998 a Evropská komise pro bezpečnost potravin (EFSA) v roce 2000 [20, 34]. FDA schválilo sukralózu i pro použití jako univerzální sladidlo pro potraviny v roce 1999 za určitých podmínek použití [34].

Sukralóza byla podrobně prostudována. Při schvalování jejího použití, jako univerzálního sladidla pro potraviny, úřad FDA přezkoumal více než 110 bezpečnostních studií [34]. Mnohé z těchto studií byly zaměřeny na zjištění možných toxických účinků včetně karcinogenních reprodukčních a neurologických účinků, ale žádné takové účinky nebyly zjištěny [1]. Výsledky dalších různých studií také prokázaly, že sukralóza není kariogenní [6]. Schválení Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) vychází ze zjištění, že sukralóza je pro lidskou spotřebu bezpečná [1].

### **2.2.9.2 Využití sukralózy**

Sukralóza je celosvětově rozšířené univerzální sladidlo, které lze nalézt v řadě potravinářských výrobků včetně pečiva, sycených i nesycených nápojů, žvýkaček, cukrovinek, želatiny, cereálií, koření, výživových výrobků a doplňků stravy, mražených mléčných dezertů a stolního sladidla. Stolní sladidla slazená sukralózou mohou obsahovat další sacharidy pro dosažení textury a objemu. Je tepelně stabilní, což znamená, že zůstává sladká i při použití při vysokých teplotách během pečení, takže je vhodná jako náhrada cukru v pečivu [6, 32, 34].

### **2.2.10 Xylitol**

Xylitol je přirozeně se vyskytující cukr, patří mezi tzv. alkoholové cukry a jedná se o nekvasící polyol příjemné chuti [1, 6, 13]. Cukr odpovídající xylitolu je xylóza, která má pět uhlíků a chutná i vypadá přesně jako sacharóza a má podobnou sladivost [1, 6]. Xylitol se u člověka metabolizuje snadno a nezávisle na inzulínu a produkuje velmi malé množství energie. Má uznávaný glykemický index 8 a jeho kalorická hodnota je 2,4 kcal/g [1]. V roce 1996 Společný výbor expertů pro potravinářské přídatné látky (JECFA) přidělil xylitolu ADI "Není specifikováno" [1]. Extrahuje se například z kukuřice nebo bezové šťávy [13]. Jeho využití v potravinářském průmyslu zahrnuje zlepšení trvanlivosti, barvy a chuti potravinářských výrobků, protože nepodléhá Maillardovu hnědnutí [33].

#### **2.2.10.1 Zdravotní nezávadnost xylitolu**

V roce 1996 JECFA potvrdil i bezpečnost xylitolu pro lidskou spotřebu. Vědecký výbor pro potraviny Evropské unie rovněž určil xylitol jako "přijatelný" pro dietní použití [1].

Několik klinických studií ukázalo, že pravidelné používání xylitolových výrobků (žvýkačky) je účinné pro prevenci vzniku zubního kazu, snížení zubního plaku a také pro zvýšení průtoku slin [1, 6, 13]. Xylitol snižuje adhezenci bakterií (tj. působí antimikrobiálně), inhibuje demineralizaci skloviny (tj. snižuje produkci kyselin) a má přímý inhibiční účinek na Mutans streptokoky. Model kontinuální kultury biofilmu ukázal, že v mladém biofilmu sacharóza významně podporuje, zatímco xylitol snižuje kolonizaci a proliferaci bakterií. Dlouhodobé účinky byly prokázány až po letech používání xylitolových žvýkaček [6].

Xylitol je přímo metabolizován v játrech, kde jeho konzumace také vede ke změnám střevní mikroflóry, alespoň ve studiích na zvířecích modelech. Údaje týkající se účinků na střevní mikroflóru jsou nedostatečné a pro jejich lepší pochopení jsou zapotřebí další studie, zejména na lidských subjektech. Dosavadní poznatky o metabolismu polyolů nejsou dostatečné pro stanovení definitivních závěrů o vlivu polyolů na střevní mikrobiom [33].

### 2.2.10.2 Využití xylitolu

Xylitol je v současné době dostupný v mnoha formách. Je schválen pro potravinářské, kosmetické a farmaceutické výrobky v přibližně 40 zemích. Používá se jako sladidlo především v nekariogenních cukrovinkách (žvýkačky, mentolové bonbony), ve farmaceutických výrobcích (tablety, pastilky do krku, vitaminové tablety, sirup proti kašli) a příležitostně v zubních přípravcích (zubní pasty, ústní vody). Významnou překážkou širokého používání xylitolu jako sladidla je jeho cena, která je v současnosti několikrát vyšší než cena sacharózy [6].

*Tabulka č. 1: Charakteristické hodnoty sladidel*

Sladidlo	Přijatelná denní dávka	Sladivost*	Glykemický index [20]
<b>Acesulfam K</b>	9–15 mg/kg	200	0
<b>Aspartam</b>	50 mg/kg	200	0
<b>Mannitol</b>	Není specifikováno	0,5	2
<b>Maltitol</b>	Není specifikováno	0,9	35
<b>Sorbitol</b>	Není specifikováno	0,6	4
<b>Sukralóza</b>	5 mg/kg	600	0
<b>Xylitol</b>	Není specifikováno	1	8

\*v porovnání se sacharózou

### 2.3 Žvýkačky

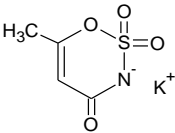
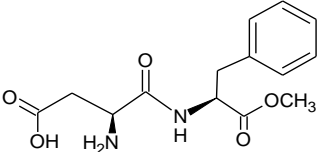
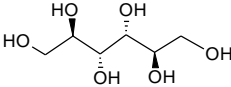
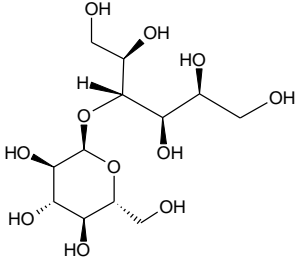
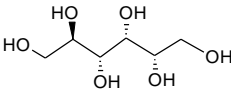
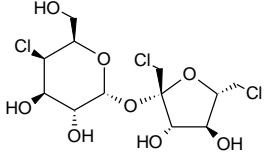
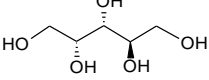
Žvýkačky mají gumovitou strukturu a v závislosti na typu konečného výrobku se skládají z různých složek, jako je cukr, polyoly, gumový základ, aroma, okyselující látky, barviva, sladidla, změkčovadla a konzervační látky. Skládají se ze dvou fází: (i) fáze žvýkačky (nerozpustná ve vodě) a (ii) fáze cukru nebo cukerného alkoholu (rozpustná ve vodě).

Hlavní složkou žvýkaček je základní guma nebo základní hmota. Žvýkačková báze obsahuje elastomer, elastomerové rozpouštědlo, polyvinylacetát, emulgátor, nízkomolekulární polyethylen, vosky, změkčovadla a plnidla. Běžné žvýkačky obsahují 20–30 % žvýkačkové báze, zatímco ty bez cukru mají v průměru až 30 % báze. Žvýkačkový základ se používá jako nosič pro rozpustnou část žvýkačky, která je vhodná k lidské spotřebě [43, 44].

Ve fázi rozpustné ve vodě lze pro žvýkačky s cukrem použít cukerná sladidla (60 %), jako je dextróza, sacharóza, fruktóza, maltóza, dextrin, galaktóza a invertní cukr, kukuřičné sirupy (18–20 %), cukerné alkoholy (<1,0 %), glycerin (<1,0 %) a aroma (0,5–1,0 %). Jako náhrada cukru pro žvýkačky bez cukru lze použít cukerné alkoholy (působí také jako objemové činidlo) (50–60 %), glycerin (5,0–6,0 %), aroma (1,0–15,0 %) a vysoce intenzivní sladidla (0,01–3,0 %). Toto nahrazení ovlivňuje jak uvolňování chuťových látek, tak i texturu výrobku. Kromě toho jsou přijímány jako nekariogenní látky (nepodporují vznik zubního kazu), protože bakterie, např. streptokoky *Streptococcus mutans*, nemohou polyoly využívat jako zdroj energie pro své rozmnožování a růst.

Xylitol může být do složení přidán samostatně, ale běžně se používá v kombinaci s levnějšími polyoly, jako je sorbitol, laktitol nebo mannitol, a to kvůli jeho relativně vysoké ceně. Polyoly se používají s vysoce intenzivními sladidly (aspartam, acesulfam K a thaumatin), protože nejsou tak sladké jako sacharóza. V opačném případě mohou spotřebitelé vnímat nízkou sladivost, což nepříznivě ovlivňuje atraktivitu výrobků [43].

Tabulka č. 2: Sladidla

Sladidlo	Strukturní vzorec	Mezinárodní označení	Chemický vzorec	Chemický název
<b>Acesulfam K</b>		E950 [20]	$C_4H_4KNO_4S$ [8]	draselná sůl 6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on-2,2-dioxid [20]
<b>Aspartam</b>		E951 [20]	$C_{14}H_{18}N_2O_5$ [8]	methyl ester L- $\alpha$ -aspartyl-L-fenylalanin [20]
<b>Mannitol</b>		E421 [20]	$C_6H_{14}O_6$ [45]	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-hexan-1,2,3,4,5,6-hexol [45]
<b>Maltitol</b>		E965 [20]	$C_{12}H_{24}O_{11}$ [46]	4-O- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-D-glucitol [46]
<b>Sorbitol</b>		E420 [20]	$C_6H_{14}O_6$ [47]	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-hexan-1,2,3,4,5,6-hexol [47]
<b>Sukralóza</b>		E955 [20]	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ [8]	1,6-dichlor-1,6-dideoxy- $\beta$ -D-fruktofuranosyl-4-chlor-4-deoxy- $\alpha$ -D-galakto-pyranosid [20]
<b>Xylitol</b>		E967 [20]	$C_5H_{12}O_5$ [48]	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-pentan-1,2,3,4,5-pentol [48]

## 2.4 Metody analýzy náhradních sladidel v potravinách

Z velkého výběru metod používaných pro stanovení sladidel v různých potravinových matricích si široké uznání získaly chromatografické metody. V současné době je v této oblasti nejoblíbenější technikou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Široká škála dostupných separačních kolon (mechanismů) spolu s působivým portfoliem detektorů činí z HPLC skutečně univerzální techniku. Kapalinová chromatografie (LC) s reverzní fází (RP-LC) je dobře známá, vyspělá technika, která se dokonale hodí pro separaci sladidel [49].

Kromě HPLC našly v této oblasti uplatnění i další separační metody. Iontová chromatografie (IC) je vhodným nástrojem pro analýzu více sladidel v potravinářských výrobcích. Namísto separace pomocí organických rozpouštědel se separace pomocí IC provádí za použití neškodných a levných roztoků solí jako eluentů [49].

Kapilární elektroforéza (CE) je další atraktivní separační technikou, která je užitečná pro simultánní stanovení více sladidel. V některých situacích se CE zdá být lepší než HPLC, pokud jde o separační výkon, dobu analýzy nebo nízkou spotřebu rozpouštědel [49].

Pokud je třeba stanovit pouze jedno nebo dvě sladidla v daném vzorku, je často rozumnější použít některou z jednoduchých, rychlých a reprodukovatelných analytických metod, specificky přizpůsobených konkrétnímu výrobku. Využívají specifické reakce nebo detekční systémy spíše než výkonnější univerzální kombinace separace a detekce, které jsou nákladné. V porovnání s multianalytickými protějšky jsou tyto postupy často méně časově a pracovně náročné, přičemž jsou srovnatelné z hlediska přesnosti, preciznosti a citlivosti [49].

### 2.4.1 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci jak většiny organických, tak anorganických látek, zejména netěkavých a termicky labilních směsí látek [50, 51]. V kapalinové chromatografii je u všech metod mobilní fází kapalina. Nejen stacionární fáze, ale i použitá mobilní fáze má důležitou roli při separaci složek vzorku, když se analyt rozděluje mezi obě fáze na základě rozdílné distribuce složek směsi [50–52]. Jako mobilní fáze se používají rozpouštědla, případně směsi rozpouštědel.

Výběr techniky také závisí na charakteru daného vzorku a požadavků na vlastní analýzu [52]. V kapalinové chromatografii se využívají různé mechanismy separace, které se často i navzájem prolínají. Patří mezi ně adsorpce, iontová výměna, rozdělování na základě různé rozpustnosti, síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii [50, 51]. Stacionární fáze je ve formě sorbentu, podle jeho uspořádání rozlišujeme různá provedení metod. Lze volit mezi uzavřeným (sloupcová chromatografie, vysokoúčinná chromatografie) anebo systémem otevřeným (tenkovrstvá, papírová chromatografie) [50–52].

Jako metoda, kterou lze zcela automatizovat i pro vyhodnocení výsledků, se používá vysokoúčinná kapalinová kolonová chromatografie (HPLC). Metoda se využívá ve výzkumu a pro přesnou kvantitativní analýzu [52].

## **2.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

### **2.4.2.1 Princip metody**

HPLC je separační metoda, kde je hlavním požadavkem rozlišení a další důležitou veličinou je rychlost analýzy. Důležitý je také rozsah systému, tj. jeho schopnost oddělovat směsi se širokým rozsahem polarit, který lze měnit změnou mobilní fáze [50, 53].

### **2.4.2.2 Mobilní fáze a směšovací zařízení**

Směšovací zařízení může naprogramováním připravit směs kapalin pocházejících ze zásobníků. Složení mobilní fáze může být udržováno konstantní (izokratická eluce) nebo se mění v průběhu analýzy (gradientová eluce) [51].

Gradientová eluce je nejvyužívanější technikou programování složení mobilní fáze měnící se v čase, takže během separace se její eluční síla zvyšuje [50, 54]. Dochází k míchání mobilní fáze z několika složek (obvykle dvou až tří), nejčastěji se využívá binární eluce, které se liší svou eluční silou [52, 54]. Jako mobilní fáze se většinou používá gradient acetonitrilu nebo methanolu ve vodě. Gradient může být lineární, mnohdy také gradient exponenciální nebo logaritmický, kdy složení mobilní fáze se mění podle těchto závislostí. Výhoda gradientové eluce je, že urychluje analýzu a zaručuje separaci složek se zcela odlišnou polaritou [50].

Izokratická eluce obnáší použití stejného složení mobilní fáze v průběhu celého procesu analýzy. Výhodou může být vyšší stupeň separace sledovaných složek, dále není nutné ustanovení počátečních podmínek před další analýzou, nevýhodou je ale délka analýzy a nejistota, zda při daném složení mobilní fáze došlo k eluci všech složek analytu z kolony [50].

### **2.4.2.3 Čerpadlo**

Vysokotlaké bezpulzní čerpadlo je velmi důležitou součástí HPLC aparatury, které zajišťuje dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze [50].

Kvalitní čerpadlo musí být schopno docilovat průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu bez kolísání průtoku při tlaku 40 MPa [50–52]. Konstrukce čerpadla nesmí být narušována mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat jakékoliv látky, proto je z odolných materiálů jako nerezová ocel, keramika či titan. Ventily řídící tok eluentu jsou většinou vyrobeny z pryže nebo safíru [51, 52]. Co nejmenší vnitřní objem čerpadla je požadován z důvodu, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze, eventuálně práci s gradientem [52].

Rozlišují se 3 druhy čerpadel: (1) pneumatické, (2) velkoobjemové pístové, (3) reciproční [50]. Recipročních čerpadel lze dělit na pístová, kdy kapalina přichází do styku s písty čerpadla, a na membránová, kde je kapalina oddělena od pístů membránou [50, 52].

### **2.4.2.4 Dávkovací zařízení**

Konstrukce zařízení pro dávkování vzorku na chromatografickou kolonu může podstatně ovlivnit účinnost separačního procesu. Jsou dostupné tři odlišné způsoby dávkování vzorků: [52]

Dávkování probíhá přímým nástřikem vzorku pomocí injekčního zařízení na vrstvu sorbentu v koloně buď přes vhodné septum nebo bez použití septa [52]. Injekční stříkačka, musí být vyrobena z inertních materiálů, jako je nerezová ocel, titan či některé polymery, protože dochází k nežádoucímu vnášení stop materiálu [51].

Dávkování vzorku vysokotlakým dávkovacím ventilem se smyčkou bez přerušení toku mobilní fáze, kdy lze dávkovat pouze konstantní objem vnitřního prostoru smyčky dávkovače. Nebo lze u dávkovačů se speciální konstrukcí plnit jen část dávkovací smyčky injekční stříkačkou a tak měnit tak dávkovaný objem [52, 54]. V současnosti se v HPLC často používá šesticestný dávkovací ventil [50]. Komerčně dostupné dávkovače mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2  $\mu\text{l}$  do 2 000  $\mu\text{l}$  [54].

Dávkování vzorků automatickými dávkovači, které na rozdíl od předchozích manuálních metod umožňuje automatické dávkování několika vzorků za sebou bez nutnosti zásahu obsluhy přístroje. Dávkovač je spojený se zásobníkem vzorků s umístěnými mikronádobkami (vialkami), které jsou uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Ty se před každým nástřikem posunou pod jehlu dávkovače [52, 54]. Vzorek je dávkován pomocí vícecestných (většinou šesticestných) ventilů nebo za pomoci více třicestných ventilů. Průtok mobilní fáze kolonou by neměl být přerušen v průběhu dávkování. K zábraně kontaminace vzorků se jehla oplachuje a to, jak z vnitřní části, tak i z vnější. Prostor pro vzorky je většinou temperován (0–50 °C) a zastíněn před světlem [54].

#### 2.4.2.5 Detektory

V metodě HPLC je k dispozici řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Volba detektoru je závislá na konkrétní aplikaci [50]. Detektory v chromatografii mají za úkol zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluent. Zpravidla se umísťují na konec kolony a analyzují tzv. efluent [52].

Po ideálním detektoru v HPLC se požaduje umožnění detekce všech přítomných látek, aby poskytoval okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací, měl vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, byl robustní ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl minimální mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón a umožnil použití gradientové eluce či jiných technik. Takový detektor pro kapalinovou chromatografii v praxi neexistuje a různé detektory se jednotlivým požadavkům do různé míry přibližují [52, 54].

Detektory lze rozdělit do dvou skupin na:

Selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v efluentu.

Univerzální (nespecifické) detektory, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti efluentu jako celku, tj. detekované komponenty a mobilní fázi [52, 54].

Nejrozšířenějšími detektory jsou spektrofotometrické detektory, fluorimetrické a refraktometrické. Dále se využívají elektrochemické, vodivostní detektory a odpařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) [51, 52, 54].

Odpařovací rozptylový detektor je univerzální detektor, který je kompatibilní s gradientovou elucí a slouží k detekci látek, které postrádají fluorofor a chromofor, jako například sacharidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, fosfolipidy [54]. ELSD měří množství světla rozptýleného částicemi analytu, které vznikají odpařováním rozpouštědla při průchodu světelného paprsku. Výsledný signál tedy odpovídá tělu sloučenin přítomných ve vzorku, které se neodpařují nebo nerozkládají během odpařování rozpouštědla nebo mobilní fáze [55].

Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Při použití těchto detektorů je nutné, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce), anebo aby eliminoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce) [50].

V současné době je běžně používán detektor s diodovým polem (Photodiode array detector, PDA), který umožňuje snímat UV-VIS spektrum každé látky v separované směsi v určeném rozsahu vlnových délek [50].

Další detektor používaný v LC je detektor refraktometrický, který měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čistou mezi mobilní fází. Detektor nelze použít pro gradientovou eluci. Při jeho použití je nutná přesná teplota [50, 51].

Voltametrický detektor je používán k detekci látek, které podléhají redoxním reakcím. Detekce je založena na měření proudu mezi polarizovatelnou elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí nebo při konstantním napětí [50].

Vodivostní detektor je používán k detekci nabitých látek (iontů) v iontové chromatografii [50].

Uplatnění nachází i hmotnostní detektor, protože umožňuje nejen citlivé kvantitativní stanovení analytu, ale také poskytuje kvalitativní informace o struktuře analytu [50].

#### **2.4.2.6 Kolony**

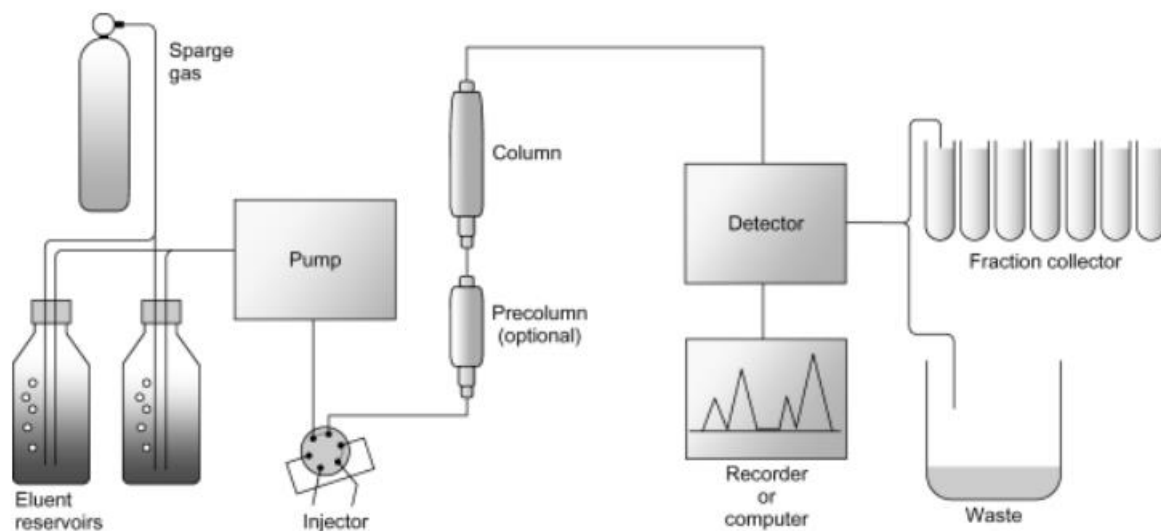
Mnoho různých aplikací kapalinové chromatografie vyžaduje existenci velkého počtu kolon různých délek, vnitřních průměrů a náplní [51].

Chromatografické kolony jsou v podstatě rovné trubky s dostatečně hladkým vnitřním povrchem pláštěm. Kolony se nejčastěji vyrábějí z antikorozi oceli, borosilikátového skla a lze využít i vysoce inertních plastů. Výběr vhodné kolony je velmi důležitý ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii, protože výsledky chromatografické analýzy jsou primárně určeny kvalitou kolony a její náplní. Kolony jsou většinou naplněny nebo pokryty silikagelem, popřípadě oxidem hlinitým, na nichž mohou být chemicky navázány nebo zakotveny různé stacionární fáze [52]. Po kolonách je požadováno, aby odolaly relativně vysokým tlakům, byly chemicky inertní a materiál kolony nepůsobil katalyticky, aby se zabránilo rozkladu vzorku během analýzy [52, 54]. V HPLC se pracuje s kolonami s délkou pohybující se mezi 5–30 cm a vnitřním průměrem mezi 2–4 mm. Separace se uskutečňuje převážně na kolonách plněnými náplněmi s velmi malými částicemi o průměru 3–10 mikrometrů a zároveň s poměrně velkým průtokem mobilní fáze, čímž se dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti této metody [50, 52, 54].

K ochraně hlavní kolony se široce používají předkolony umístěné před analytickou kolonou. Chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými látkami a tím slouží k prodloužení životnosti kolony [51].

#### **2.4.2.7 Stanovení sladidel**

LC je nejoblíbenější volbou pro stanovení vysoce intenzivních sladidel. Postupy HPLC jsou založeny na izokratické nebo gradientové RP chromatografické separaci. Ve spojení s LC se používají různé detekční systémy (např. ultrafialová (UV) spektrofotometrie, amperometrie, coulometrie, hmotnostní spektrometrie (MS), spektrofluorometrie, rozptyl světla a konduktometrie) [49].



**Obrázek 6:** *Uspořádání HPLC [56]*

Vybavení vysokoúčinného kapalinového chromatografu zahrnuje zásobníky mobilní fáze, odplyňovací zařízení, vysokotlaké čerpadlo, injektor, předkolonu, kolonu, detektor, odpadní nádrž a záznamník nebo datový systém [56].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité chemikálie

##### 3.1.1 Chemikálie pro mobilní fázi

- Destilovaná voda
- Acetonitril,  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich
- Octan amonný,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich
- Triethylamin,  $\geq 99\%$ , VWR Chemicals
- Kyselina mravenčí, 99–100 %, VWR Chemicals
- Methanol,  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich
- Aceton,  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich

##### 3.1.2 Standardy náhradních sladidel

*Tabulka č. 3: Použité standardy náhradních sladidel pro optimalizaci metody*

Název	Čistota (%)	Molární hmotnost ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Výrobce	Země původu	CAS
Acesulfame K	$\geq 99,0$	201,24	Sigma-Aldrich	Německo	55589-62-3
Aspartame	99,88	294,30	Sigma-Aldrich	USA	22839-47-0
D-Mannitol	$\geq 98$	182,17	Sigma-Aldrich	Francie	69-65-8
Maltitol	$\geq 98$	344,31	Sigma-Aldrich	Čína	585-88-6
D-Sorbitol	99	182,17	Sigma-Aldrich	USA	50-70-4
Sucralose	$\geq 98,0$	397,63	Sigma-Aldrich	Čína	5603-13-2
Xylitol	$\geq 99$	152,15	Sigma-Aldrich	Finsko	87-99-0

#### 3.2 Použité laboratorní pomůcky

- Běžné laboratorní sklo a vybavení
- Skleněné šroubovací vialky 2ml s uzávěrem
- Automatické pipety a špičky
- Plastové stříkačky
- Mikrofiltry s velikostí pórů  $0,45\ \mu\text{m}$
- Lodičky, laboratorní lžice

#### 3.3 Použité přístroje

- Analytické váhy Entris 224i-1S, Sartorius
- Ultrazvuk
- Magnetická míchačka
- HPLC, Agilent Technologies USA, Agilent 1260 Infinity s ELSD detektorem
- HPLC, Shimadzu LC-10A s RI detektorem
- Počítač
- Lednice s mrazákem

### 3.4 Použité kolony

Pro optimalizaci metody bylo testováno těchto pět kolon:

- Rezex RPM-Monosaccharide Pb<sup>2+</sup> (8%) (300 x 7,8 mm)
- Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm)
- Waters Carbohydrate Analysis (300 x 3,9 mm)
- Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A (250 x 4,6 mm)
- Poroshell 120 EC-C18 (150 x 4,6 mm) 2.7-Micron

### 3.5 Popis vzorků

Pro samotnou analýzu bylo vybráno 12 vzorků žvýkaček (viz obrázek 7), obsahujících některé z běžně používaných náhradních sladidel, dostupných v obchodních řetězcích a na internetových obchodech. V *Tabulce č. 4* je uveden seznam vzorků a jejich popis.

**Tabulka č. 4: Seznam analyzovaných vzorků**

Vzorek	Název	Výrobce	Deklarovaná sladidla
1.	Orbit Spearmint	MARS Czech s.r.o.	acesulfam K, aspartam, mannitol, sorbitol, sukralóza, xylitol
2.	Winterfresh Original	MARS Czech s.r.o.	acesulfam K, aspartam, maltitol, mannitol, sorbitol
3.	Airwaves Cool cassis	MARS Czech s.r.o.	acesulfam K, aspartam, isomalt, maltitolový sirup, mannitol, sorbitol, sukralóza
4.	Wrigley's Spearmint	MARS Czech s.r.o.	acesulfam K, sukralóza
5.	Juicy Fruit	MARS Czech s.r.o.	acesulfam K, mannitol, sorbitol, sukralóza, xylitol
6.	Halls Gum peppermint	Mondelez Czech Republic s.r.o.	acesulfam K, aspartam, isomalt, maltitol, sorbitol, sukralóza
7.	K Classic Chewing Gum Spear-mint with Xylitol	Continental Confectionery Company	acesulfam K, aspartam, maltitol, sorbitol, xylitol
8.	Five spearmint	MARS GmbH	acesulfam K, aspartam, mannitol, sorbitol, xylitol
9.	E Breeze	Quattro Trading B.V.	isomalt, maltitol, sorbitol, sukralóza
10.	Hugo žvýkačky Fresh Fruit	Martin Veleba	xylitol
11.	Miradent Xylitol watermelon	Hager & Werken GmbH & Co. KG	xylitol
12.	JETgum strong cassis	LIDL Slovenská republika, v.o.s.	acesulfam K, aspartam, maltitol, sorbitol



**Obrázek 7:** Vybrané vzorky k analýze

### 3.6 Použité pracovní postupy

#### 3.6.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace bylo najít nejvhodnější chromatografickou kolonu pro současnou separaci všech přítomných náhradních sladidel ve žvýkačkách. Principem optimalizace bylo testování separace směšného standardu sladidel běžně se vyskytujících ve žvýkačkách. K identifikaci separovaných sladidel sloužily stanovené retenční časy samostatných sladidel. Analýzy byly provedeny pomocí HPLC s ELSD a RI detektorem.

##### 3.6.1.1 Identifikace retenčních časů sladidel pro dané kolony

Pro optimalizaci byly připraveny standardní roztoky jednotlivých sladidel o koncentraci  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  pro identifikaci retenčních času, u analýz s použitím ELSD detektoru byly roztoky zředěny na  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Samotná optimalizace probíhala se směšným standardem, ve kterém každé sladidlo mělo koncentraci  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Nejdříve postupně podlely analýze jednotlivé standardy sladidel a poté následovala analýza směšného vzorku standardu. Parametry pro analýzu byly voleny v závislosti na použité koloně viz *Tabulka č. 5*.

##### 3.6.1.2 Optimalizace mobilní fáze

Výběr mobilní fáze a její složení má významný vliv na separaci a identifikaci látek. Pro analýzu sladidel kolonou Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) byla zvolena směs acetonitrilu a vody v různých poměrech. Regulováno bylo množství acetonitrilu z důvodů oddělení a posunutí píků od sebe. Vyzkoušeny byly tři různé poměry a také samostatná voda. Jednalo se o 5 %, 7 % a 10 % acetonitrilu ve vodě. Celý proces analýzy probíhal za použití izokratické eluce.

*Tabulka č. 5: Parametry analýz*

<i>Kolona</i>	<i>Přístroj</i>	<i>Složení mobilní fáze (%v/v)</i>	<i>Průtok mobilní fáze (mL/min)</i>	<i>Teplota (°C)</i>
Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm)	HPLC Agilent Infinity 1260 s ELSD detektorem	acetonitril:voda (5:95) / (7:93) / (10:90) / (0:100)	0,5	85
Rezex RPM-Monosaccharide Pb <sup>2+</sup> (8%) (300 x 7,8 mm)	HPLC Agilent Infinity 1260 s ELSD detektorem	voda	0,6	80
Waters Carbohydrate Analysis (300 x 3,9 mm)	Shimadzu LC-10A s RI detektorem	acetonitril:voda (80:20)	1,2	35
Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A (250 x 4,6 mm)	Shimadzu LC-10A s RI detektorem	acetonitril:voda (80:20)	1,0	30
Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A (250 x 4,6 mm)	Shimadzu LC-10A s RI detektorem	acetonitril:voda (80:20) + 10 mM octan amonný	1,0	30
Poroshell 120 EC-C18 (150 x 4,6 mm) 2.7-Micron	Shimadzu LC-10A s RI detektorem	triethylamin + kyselina mravenčí:methanol:aceton (85:10:5)	0,5	30

### 3.6.2 Příprava vzorků

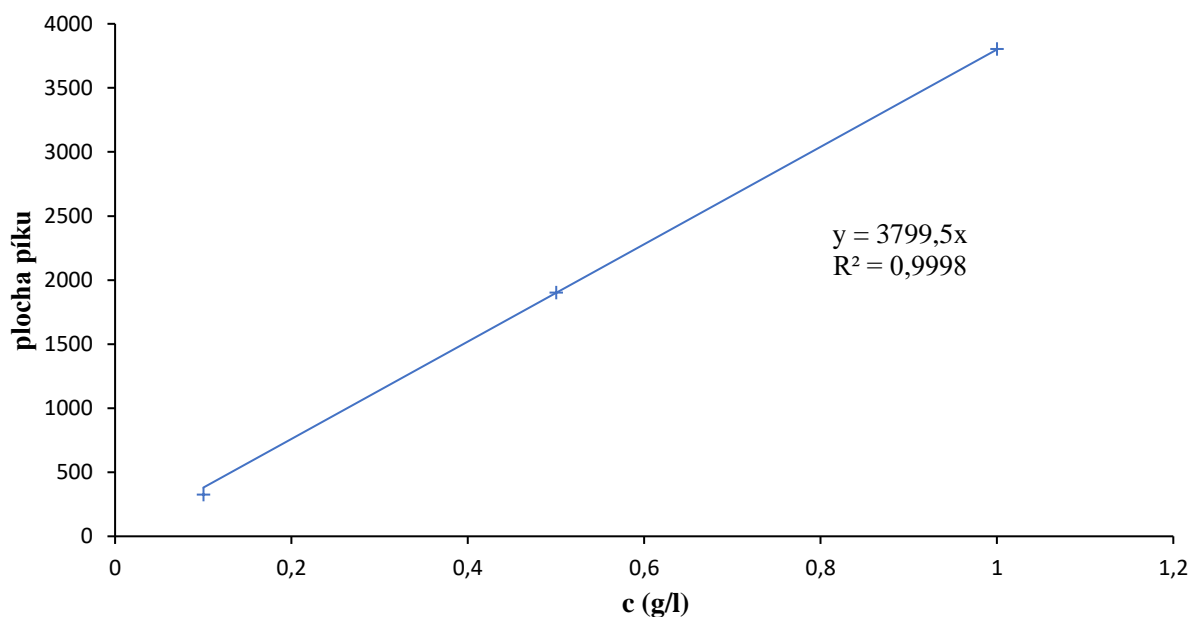
Příprava vzorků vycházela z normy (ČSN EN 15086). Vzorky žvýkaček bylo nutné nejprve hluboce zmrazit. Následně byly zhomogenizovány za pomoci tloučku. Do 50 ml Erlenmayerových baněk byly naváženy 2 g homogenizovaného vzorku, který byl smísen se 20 ml deionizované vody. Směs byla extrahována po dobu 30 minut na magnetické míchače. Vzorky žvýkaček byly přefiltrovány přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  pomocí injekční stříkačky. Zfiltrované roztoky byly 25krát zředěny a nadávkovány do vialek. Bylo provedeno několik paralelních stanovení.

### 3.6.3 Příprava kalibračních roztoků

Pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny postupným ředěním deionizovanou vodou směsné roztoky se všemi sedmi standardy sladidel o koncentracích 1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , 0,5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a 0,1  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . 1 ml roztoku od každé koncentrace byl napipetován do 2ml vialek a byly zanalyzovány na HPLC-ELSD s nastavením uvedeným v *Tabulce č. 6*. Na *Obrázku 8* se nachází vzorová kalibrační křivka pro maltitol.

*Tabulka č. 6: Parametry pro stanovení vybraných sladidel*

<b>Přístroj</b>	HPLC Agilent Infinity 1260 s ELSD detektorem
<b>Kolona</b>	Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm)
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril:voda (7:93) %v/v
<b>Objem nástřiku</b>	5,0 $\mu\text{l}$
<b>Průtok mobilní fáze</b>	0,5 mL/ min
<b>Teplota</b>	85 °C
<b>Doba analýzy</b>	30 min



*Obrázek 8: Kalibrační křivka pro maltitol*

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Výběr kolony

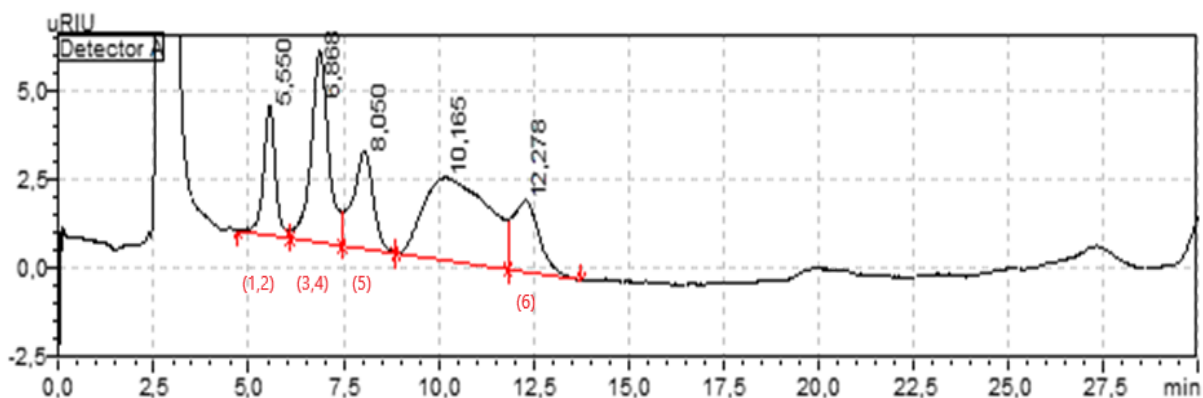
V rámci optimalizace metody pro analýzu náhradních sladidel probíhalo testování pěti kolon. Jako vzorek byl využit směsný standard sedmi sladidel – acesulfamu K, aspartamu, mannitolu, maltitolu, sorbitolu, sukralózy a xylitolu. Cílem bylo najít co nejjednodušší univerzální metodu, která je schopná navzájem odseparovat všechna náhradní sladidla běžně se vyskytující ve žvýkačkách. Což bylo i hlavním hodnotícím faktorem pro výběr vhodné metody.

Na základě získaných výsledků uvedených v *Tabulce č. 7* a přiložených chromatogramů byla zvolena kolona Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm), pomocí ní bylo odseparováno nejvíce sladidel. Nedošlo pouze k odseparování aspartamu a acesulfamu K, pravděpodobně z důvodu rozdílné struktury od ostatních stanovovaných sladidel, pro které je kolona primárně určena. Kolony Agilent Hi-Plex jsou iontově výměnné ligand-výměnné kolony používané pro detekci cukrů, cukerných alkoholů a organických kyselin [57].

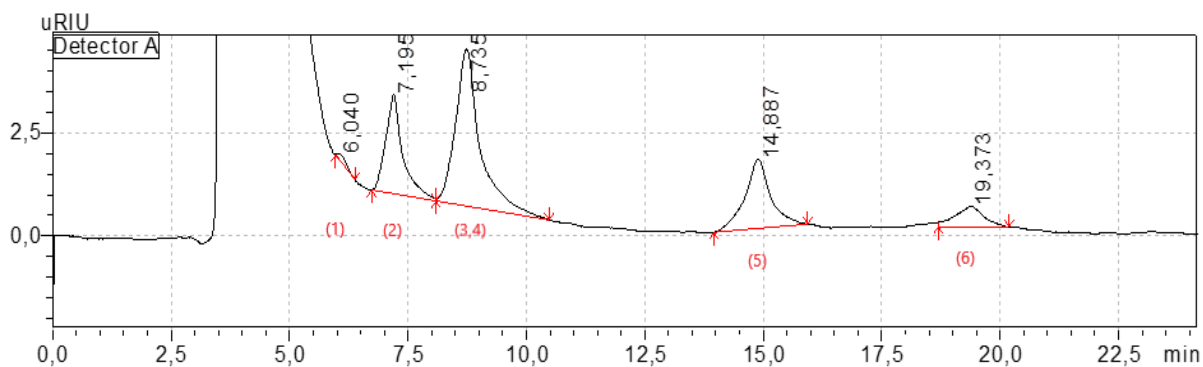
Analýza byla provedena na základě normy ČSN EN 15086, která je specifikována pro stanovení polyolů, kde je HPLC metoda validována na vzorcích žvýkaček pro maltitol, mannitol a sorbitol za použití RI detektoru a analytické separační kolony naplněné iontoměničem v  $\text{Ca}^{++}$  cyklu [58].

Ostatní kolony byly vyhodnoceny jako nevhodné z důvodů velkého počtu překrývajících se píků nebo pro schopnost stanovit pouze malou část ze sladidel.

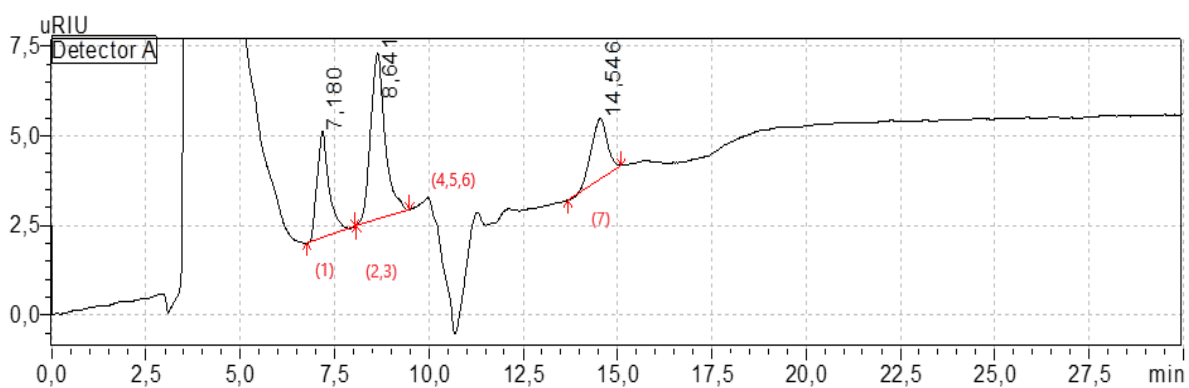
Pro stanovení všech námi zvolených běžných sladidel ve žvýkačkách nelze použít pouze jednu kolonu pro jednoduché stanovení, je nutné použití více kolon pro detekci a odseparování všech píků. Dle námi získaných dat se jeví jako nejlepší kombinace Agilent Hi-Plex Ca jako hlavní kolony a doplňkové Poroshell 120 EC-C18, druhou možností je jako doplňková Luna Omega 3  $\mu\text{m}$  SUGAR 100 A, díky schopnosti odseparovat acesulfam K a aspartam. Při nevyužití Agilent Hi-Plex Ca je dle normy doporučována Rezex RPM-Monosaccharide  $\text{Pb}^{2+}$  (8%), u které se naskytuje jediná možnost kombinace s Poroshell 120 EC-C18 a Luna Omega 3  $\mu\text{m}$  SUGAR 100 A.



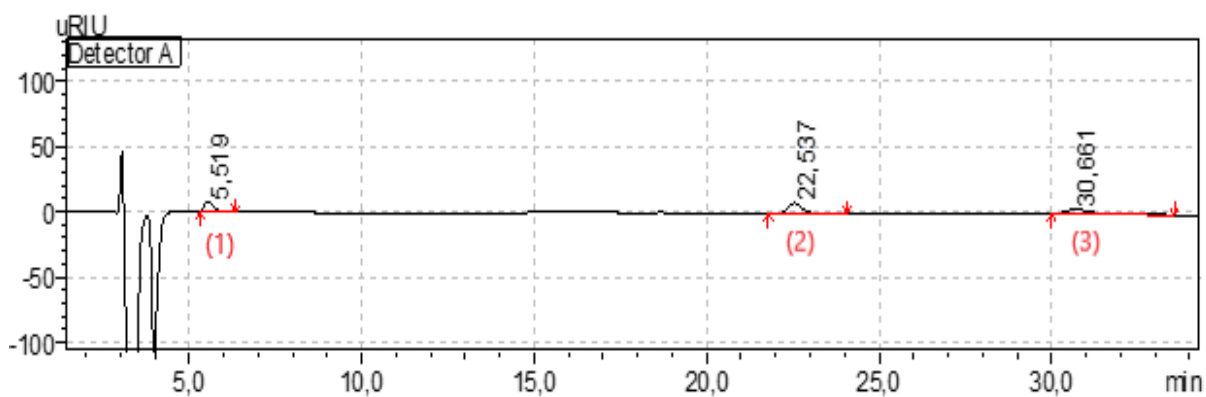
**Obrázek 9:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Waters Carbohydrate Analysis (300 x 7,8 mm), kde je (1,2) xylitol a acesulfam K, (3,4) sorbitol a mannitol, (5) aspartam, (6) maltitol



**Obrázek 10:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A (250 x 4,6 mm), kde je (1) acesulfam K, (2) xylitol, (3,4) sorbitol a mannitol, (5) maltitol, (6) aspartam



**Obrázek 11:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A (250 x 4,6 mm) + 10 mM octan ammonný, kde je (1) xylitol, (2,3) sorbitol a mannitol, (4,5,6) aspartam, acesulfam K a sukralóza, (7) maltitol



**Obrázek 12:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Poroshell 120 EC-C18 (150 x 4,6 mm) 2.7-Micron, kde je (1) acesulfam K, (2) aspartam, (3) sukralóza

Tabulka č. 7: Výsledky identifikace náhradních sladidel ve směsném vzorku

Kolona						
Náhradní sladidla	Rezex RPM- Monosaccharide Pb <sup>2+</sup> (8%)	Agilent Hi-Plex Ca	Waters Carbohydrate Analysis	Luna Omega 3 μm SUGAR 100 A	Luna Omega 3 μm SUGAR 100 A + pufr	Poroshell 120 EC-C18
<b>Acesulfam K</b>	*	*	**	Detekován	*	Detekován
<b>Aspartam</b>	*	*	Detekován	Detekován	*	Detekován
<b>Mannitol</b>	Detekován	Detekován	*	*	**	–
<b>Maltitol</b>	**	Detekován	Detekován	Detekován	Detekován	–
<b>Sorbitol</b>	Detekován	Detekován	*	*	**	–
<b>Sukralóza</b>	**	Detekována	–	–	*	Detekována
<b>Xylitol</b>	Detekován	Detekován	**	Detekován	Detekován	–

\* dvojice či trojice překrývajících se píků

\*\* dvojice překrývajících se píků

#### 4.1.1 Vliv složení mobilní fáze na separaci vybraných sladidel

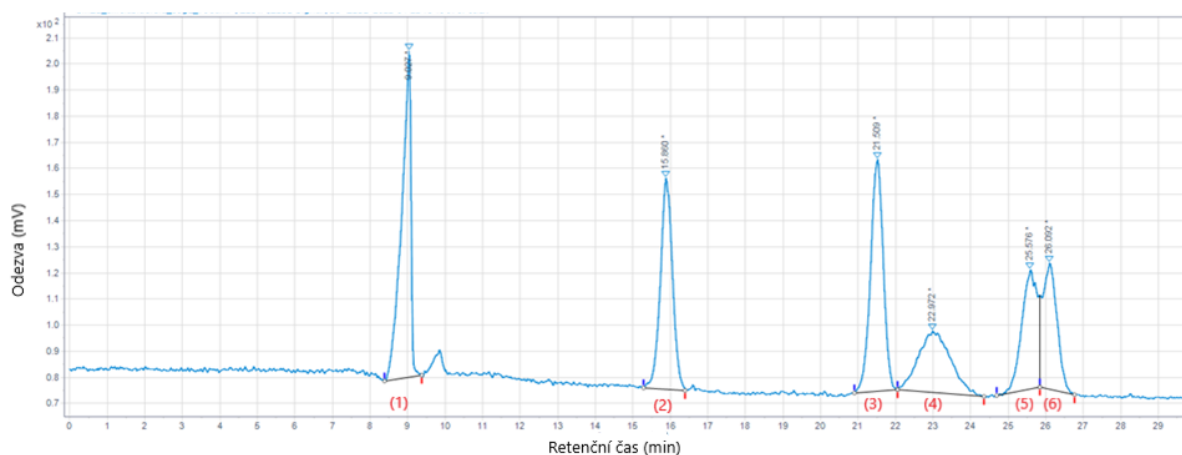
Mobilní fáze byla podrobena optimalizaci viz kapitola 3.6.1.2, na základě analýz s různým složením mobilní fáze na koloně Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) bylo určeno za ideální poměr acetonitril:voda (7:93) %<sub>v/v</sub>, kdy bylo dosaženo odseparování všech píků oproti dalším složením, kromě aspartamu a acesulfamu K. Jak je patrné z přiložených chromatogramů viz *Obrázek 13–16*. Voda, jakožto doporučovaná mobilní fáze normou i výrobcem kolony byla vyhodnocena jako nevhodná, z důvodu neodseparování xylitolu a sorbitolu. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v *Tabulce č. 8*.

Pro zdokonalení odseparování všech píků je možné najít a využít optimální poměr mezi 7 % a 10 % acetonitrilu. Při analýze standardů sladidel bylo 7 % acetonitrilu dostačující, ale vzhledem k odlišnému chování reálných vzorků, byly vzorky dodatečně zanalyzovány i s 10 % acetonitrilu pro odseparování xylitolu a sorbitolu.

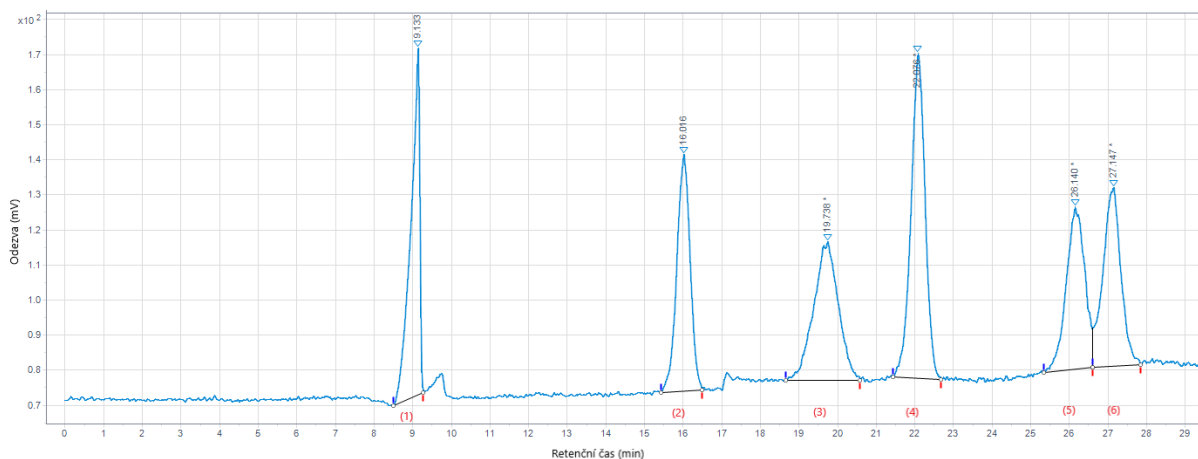
*Tabulka č. 8: Výsledky optimalizace mobilní fáze*

Sladidla	Koncentrace acetonitril:voda (% <sub>v/v</sub> )			
	0:100	5:95	7:93	10:90
<b>Acesulfam K</b>	*	*	*	*
<b>Aspartam</b>	*	*	*	*
<b>Mannitol</b>	Detekován	Detekován	Detekován	Detekován
<b>Maltitol</b>	Detekován	Detekován	Detekován	**
<b>Sorbitol</b>	**	**	Detekován	Detekován
<b>Sukralóza</b>	Detekována	Detekován	Detekován	**
<b>Xylitol</b>	**	**	Detekován	Detekován

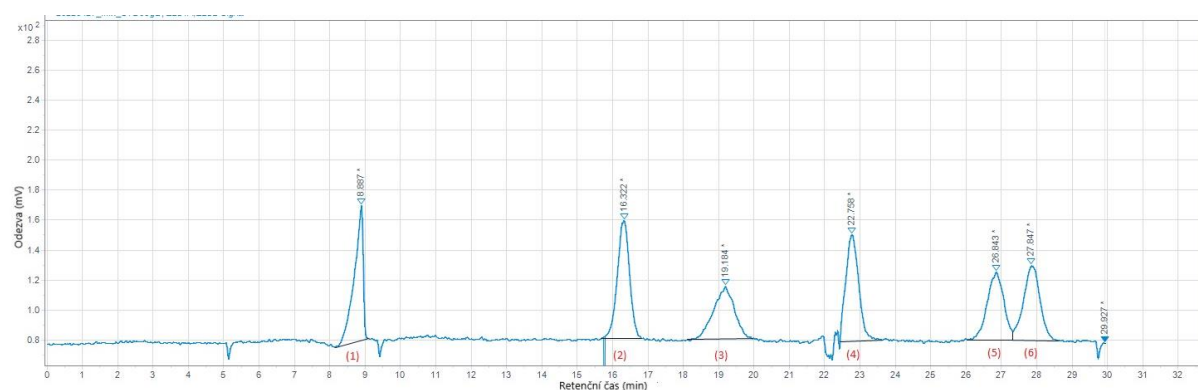
\*, \*\* dvojice překrývajících se píků



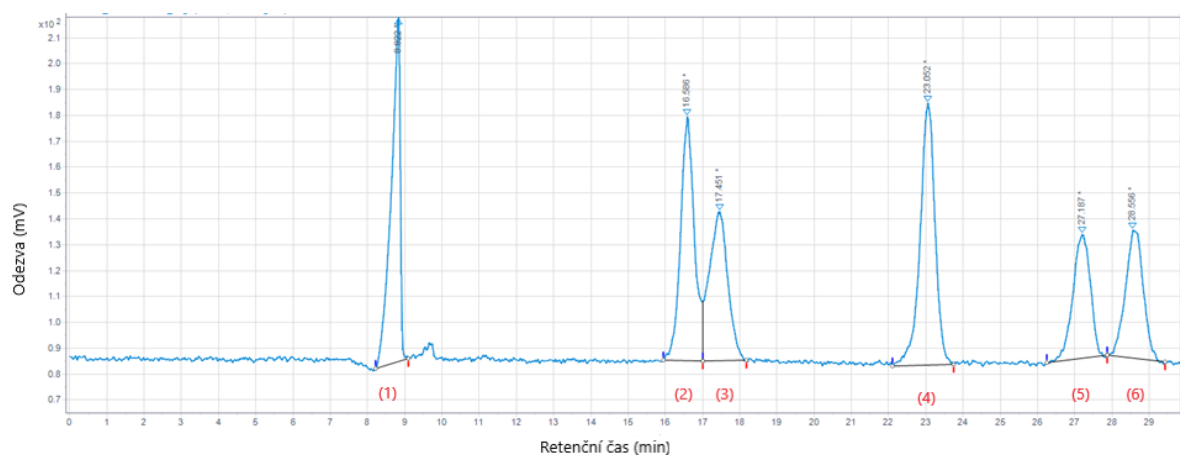
*Obrázek 13: Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) voda, kde je (1) acesulfam K a aspartam, (2) maltitol, (3) sukralóza, (4) mannitol, (5) xylitol, (6) sorbitol*



**Obrázek 14:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) acetonitril:voda (5:95) %<sub>v/v</sub>, kde je (1) acesulfam K a aspartam, (2) maltitol, (3) sukralóza, (4) mannitol, (5) xylitol, (6) sorbitol



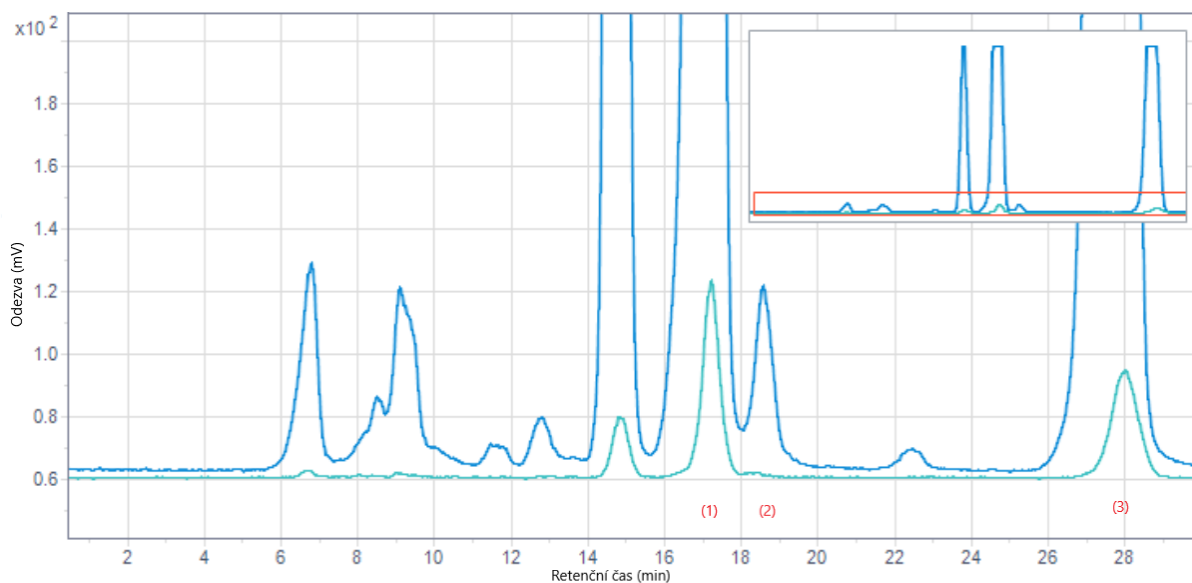
**Obrázek 15:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) acetonitril:voda (7:93) %<sub>v/v</sub>, kde je (1) acesulfam K a aspartam, (2) maltitol, (3) sukralóza, (4) mannitol, (5) xylitol, (6) sorbitol



**Obrázek 16:** Chromatogram směsi standardů náhradních sladidel, Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) acetonitril:voda (10:90) %<sub>v/v</sub>, kde je (1) acesulfam K a aspartam, (2) maltitol, (3) sukralóza, (4) mannitol, (5) xylitol, (6) sorbitol

## 4.2 Stanovení sladidel v reálných vzorcích

Po optimalizaci byla metoda ověřena na dvanácti reálných vzorcích. Popis vybraných vzorků a postup jejich přípravy před analýzou jsou uvedeny v kapitolách 3.5 a 3.6.2. Každý vzorek žvýkačky byl proměřen dvakrát. Naměřením byly zjištěny plochy píků jednotlivých sladidel, které byly identifikovány za pomoci dříve zjištěných retenčních časů. Z kalibračních závislostí vypočtené koncentrace náhradních sladidel v reálných vzorcích jsou uvedeny v *Tabulce č. 9* a v *Tabulce č. 10* se nachází obsah sladidel vztažený na jeden kus žvýkačky. Vzorový chromatogram pro reálný vzorek je na *Obrázku 17*.



**Obrázek 17:** Chromatogram sladidel ve žvýkačkách E Breeze, kde je (1) maltitol, (2) sukralóza, (3) sorbitol

**Tabulka č. 9: Naměřené koncentrace sladidel v reálných vzorcích**

Vzorek	Koncentrace ± směrodatná odchylka (mg/g)						
	acesulfam K	aspartam	maltitol	mannitol	sorbitol	sukralóza	xylitol
1.	*	*	---	1,52 ± 0,04	162 ± 17	0,734 ± 0,188	178 ± 27
2.	*	*	291 ± 9	3,58 ± 0,19	222 ± 15	---	---
3.	*	*	161 ± 36	2,03 ± 0,04	200 ± 50	0,828 ± 0,099	---
4.	*	---	---	---	---	0,614 ± 0,408	---
5.	*	---	---	13,1 ± 0,7	306 ± 43	1,73 ± 0,81	24,6 ± 12,1
6.	*	*	9,66 ± 0,63	---	188 ± 45	0,35 ± 0,01	---
7.	*	*	1,71 ± 0,50	1,67 ± 0,51 (---)	413 ± 31	---	11,2 ± 5,1
8.	*	*	---	14,9 ± 1,4	Nedetekován	---	472 ± 68
9.	---	---	137 ± 14	---	118 ± 9	4,45 ± 0,07	---
10.	---	---	---	---	---	---	508 ± 8
11.	---	---	---	---	---	---	452 ± 3
12.	*	*	205 ± 35	1,00 ± 0,08 (---)	123 ± 1	---	---

--- Není uvedeno ve složení na obale výrobku

\* Samostatná sladidla nedetekovatelná – překrývající se píky

**Tabulka č. 10: Množství sladidel v jednom kusu žvýkačky**

Vzorek	Hmotnost 1 kusu (g)	Koncentrace v 1 kusu (mg)				
		maltitol	mannitol	sorbitol	sukralóza	xylitol
1.	1,4	---	2,13 ± 0,04	227 ± 16	1,03 ± 0,19	248 ± 27
2.	1,4	407 ± 9	5,01 ± 0,19	311 ± 15	---	---
3.	1,4	225 ± 36	2,84 ± 0,04	280 ± 50	1,16 ± 0,10	---
4.	2,6	---	---	---	1,60 ± 0,41	---
5.	2,6	---	34,1 ± 0,7	796 ± 43	4,50 ± 0,81	64,0 ± 12,1
6.	1,4	13,5 ± 0,6	---	263 ± 45	0,49 ± 0,01	---
7.	1,0	1,71 ± 0,50	1,67 ± 0,51 (---)	413 ± 31	---	11,2 ± 5,1
8.	2,3	---	34,3 ± 1,4	Nedetekován	---	1090 ± 68
9.	1,4	192 ± 14	---	165 ± 9	6,23 ± 0,07	---
10.	1,5	---	---	---	---	761 ± 8
11.	1,0	---	---	---	---	452 ± 3
12.	1,4	287 ± 35	1,40 ± 0,08 (---)	172 ± 1	---	---

--- Není uvedeno ve složení na obale výrobku

Z výsledků analýzy uvedených v *Tabulce č. 9* je patrné, že identifikovaná sladidla téměř ve všech testovaných vzorcích odpovídaly složení uvedenému na obalu. Pouze u vzorků č. 7 a 12 byl stanoven v nízkých koncentracích mannitol, který není deklarovaný výrobcem, možnou příčinou může být kontaminace výrobní šarže. U vzorku č. 8 nedošlo k oddělení sorbitolu a xylitolu, sorbitol se pravděpodobně ve vzorku vyskytuje ve velice nízké koncentraci, protože ve zbývajících vzorcích (1,5,7), které obsahovaly tyto dvě sladidla došlo zvýšením acetonitrilu v mobilní fázi k odseparování. Koncentrace acesulfamu K a aspartamu nebyly stanoveny z důvodu neodseparování píků a nízké koncentrace volené díky vysoké sladivosti těchto dvou sladidel v poměru k používanému množství. Výrobci neudávají množství přítomných sladidel na obalech žvýkaček, proto nelze stanovené koncentrace ověřit s deklarovanými.

Rozdílné koncentrace zastoupených sladidel zapříčinily nutnost měření s dvěma různými ředěními a různými poměry mobilní fáze. Mannitol a sukralóza se vždy vyskytovaly v nízkém množství přibližujícím se až k limitům detekce, zejména sukralóza u níž je potřeba množství látky mnohem nižší, což je dáno její vysokou sladivostí. Nejnižší stanovená koncentrace sukralózy ve vzorku činila 0,35 mg/g. Na rozdíl od maltitolu, sorbitolu a xylitolu nacházejících se ve vysoké koncentraci, které musely být 25krát zředěny, aby mohly být stanoveny. Ze všech analyzovaných vzorků žvýkaček byla nejvyšší koncentrace 508 mg/g stanovena pro xylitol u vzorku č. 10. Rozdíly lze pozorovat na *Obrázku 17*, který obsahuje dva výsledné chromatogramy z analýz neředěného a 25krát zředěného vzorku č. 9, kdy v první analýze byla získána plocha píku sukralózy a v druhé maltitolu a sorbitolu.

Odchytky ve stanovených koncentracích způsobila problematická příprava vzorku a obtížná extrakce sladidel kvůli velkému množství gumové báze, proto paralelní navážené vzorky mohly obsahovat různé poměry gumové báze a přísad zahrnující sladidla.

Neidentifikovatelné píky, které je možno vidět na *Obrázku 17*, mohou být zapříčiněny přítomností dalších složek žvýkaček jako jsou například barviva a aromatické látky. Zde se nabízí možnost vyřešení vzorků Carrezovými roztoky, což je doporučováno normou.

## 5 ZÁVĚR

Hlavním cílem bakalářské práce bylo vyvinutí jednoduché metody pro účinné simultánní stanovení náhradních sladidel ve žvýkačkách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Motivací práce je zvyšující se růst používání těchto sladidel a jejich celosvětová oblíbenost z důvodu poptávky po nízkokalorických potravinách. Odlišná struktura jednotlivých sladidel znemožňuje použití jedné univerzální metody pro stanovení všech přítomných sladidel.

Dle nařízení (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům patří žvýkačky mezi potraviny, které jsou osvobozeny od požadavku na povinné výživové údaje [59]. Proto se práce zaměřila na průzkum průměrných koncentrací náhradních sladidel, které jsou deklarovány výrobcem na obalu bez uvedení množství, neboť zvýšené koncentrace těchto látek mohou mít i nepříznivé účinky na lidské zdraví.

Experimentální část práce byla zaměřena zejména na výběr co nejvhodnější kolony a optimalizace složení mobilní fáze pro stanovení acesulfamu K, aspartamu, mannitolu, maltitolu, sorbitolu, sukralózy a xylitolu. Důraz byl kladen na co nejlepší odseparování píků jednotlivých sladidel přítomných ve vzorku. Z testovaných pěti kolon byla pro analýzu zvolena kolona Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm), protože je vhodná především pro stanovení alkoholových cukrů, které se ve žvýkačkách vyskytují v nejvyšších koncentracích. Byla vybrána i na základě normy ČSN EN 15086, která tuto kolonu doporučuje pro stanovení tří uvedených sladidel (mannitol, maltitol, sorbitol). Tato kolona se ukázala se jako nevhodná pro stanovení aspartamu a acesulfamu K, což bylo způsobeno hlavně odlišnou strukturou od ostatních stanovovaných sladidel a jejich nízkou koncentrací díky vysoké sladivosti.

Problematický se při analýze jednotlivých sladidel ukázal být rozdíl v koncentracích, který znemožňoval najít optimálního zředění a poměru mobilní fáze. Intenzivní sladidla (acesulfam K, aspartam a sukralóza) se vyznačují vysokou sladivostí, a proto se nachází v potravinách v menším množství. Naproti tomu objemová sladidla (mannitol, maltitol, sorbitol, xylitol) mají podstatně nižší sladivost, proto se používají v množství vyšším.

Z výsledků této bakalářské práce je možné vyvodit, že nelze použít jednu univerzální metodu pro stanovení všech náhradních sladidel ve žvýkačkách. Pro tyto účely by bylo potřeba využít dvou kolon pro stanovení cukerných alkoholů Agilent Hi-Plex Ca (300 x 7,7 mm) a pro intenzivní sladidla kolonu s nepolární stacionární fází (na oktadecylovaném silikagelu). Pomocí zvolené metody byla potvrzena přítomnost všech deklarovaných alkoholových cukrů a sukralózy, s výjimkou vzorku č. 9, kdy nebyl detekován sorbitol a u vzorků č. 7 a 12 byl navíc stanoven mannitol, který nebyl výrobcem uveden.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CHATTOPADHYAY, Sanchari, Utpal RAYCHAUDHURI a Runu CHAKRABORTY. Artificial sweeteners – a review. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2014, **51**(4), 611–621 [vid. 2021-11-20]. ISSN 0022-1155, 0975-8402. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-011-0571-1
- [2] LI, Xiaomin, Shuangqing LI, Hongmei LI, Jing WANG, Qin LUO a Xiong YIN. Quantification of artificial sweeteners in alcoholic drinks using direct analysis in real-time QTRAP mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2021, **342**, 128331 [vid. 2021-11-20]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128331
- [3] CHANG, Chui-Shiang a Tai Sheng YEH. Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2014, **22**(3), 318–328 [vid. 2022-02-07]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2014.01.024
- [4] MA, Xiaoyan, Zhanghua LIU, Yulong YANG, Lidan ZHU, Jing DENG, Sijia LU, Xueyan LI a Andrea M. DIETRICH. Aqueous degradation of artificial sweeteners saccharin and neotame by metal organic framework material. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **761**, 143181 [vid. 2021-11-20]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143181
- [5] GREMBECKA, Małgorzata. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology* [online]. 2015, **241**(1), 1–14 [vid. 2021-11-20]. ISSN 1438-2377, 1438-2385. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-015-2437-7
- [6] GUPTA, Megha. Sugar Substitutes: Mechanism, Availability, Current Use and Safety Concerns-An Update. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2018, **6**(10), 1888–1894 [vid. 2021-11-20]. ISSN 1857-9655. Dostupné z: doi:10.3889/oamjms.2018.336
- [7] TOUGER-DECKER, Riva a Cor VAN LOVEREN. Sugars and dental caries. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, **78**(4), 881S-892S [vid. 2022-03-05]. ISSN 0002-9165, 1938-3207. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/78.4.881S
- [8] SCHIANO, Concetta, Vincenzo GRIMALDI, Michele SCOGNAMIGLIO, Dario COSTA, Andrea SORICELLI, Giovanni Francesco NICOLETTI a Claudio NAPOLI. Soft drinks and sweeteners intake: Possible contribution to the development of metabolic syndrome and cardiovascular diseases. Beneficial or detrimental action of alternative sweeteners? *Food Research International* [online]. 2021, **142**, 110220 [vid. 2021-11-20]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110220

- [9] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [10] HOZA, Ignác a Daniela KRAMÁŘOVÁ. *Potravinářská biochemie I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 978-80-7318-295-3.
- [11] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 978-80-902391-4-2.
- [12] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 978-80-7013-435-1.
- [13] ŠOLCOVÁ, Olga a Martina MATĚJKOVÁ. *Není éčko jako éčko*. Vydání 1. Praha: Středisko společných činností AV ČR, v.v.i., pro Kancelář Akademie věd ČR, 2017. Strategie AV21. Špičkový výzkum ve veřejném zájmu. ISBN 978-80-200-2718-4.
- [14] CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA, Aneta, Małgorzata RUMIŃSKA, Anna JEZNACH-STEINHAGEN a Iwona BONIECKA. Fructose – an effect on metabolic disorders [online]. 2018, **24**(1), 141–154. ISSN 1644-2296. Dostupné z: doi:10.5601/jelem.2018.23.3.1694
- [15] RIVEROS, María Jesús, Alejandra PARADA a Paulina PETTINELLI. CONSUMO DE FRUCTOSA Y SUS IMPLICACIONES PARA LA SALUD; MALABSORCIÓN. *NUTRICION HOSPITALARIA* [online]. 2014, (3), 491–499 [vid. 2022-03-15]. ISSN 0212-1611. Dostupné z: doi:10.3305/nh.2014.29.3.7178
- [16] HOSSAIN, Md Lokman, Lee Yong LIM, Katherine HAMMER, Dhanushka HETTIARACHCHI a Cornelia LOCHER. Honey-Based Medicinal Formulations: A Critical Review. *Applied Sciences* [online]. 2021, **11**(11), 5159 [vid. 2022-03-15]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11115159
- [17] MCMURRY, John a VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. *Organická chemie*. V Brně; V Praze: VUTIUM ; Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [18] PORTNOY, Matilde a David M. BARBANO. Lactose: Use, measurement, and expression of results. *Journal of Dairy Science* [online]. 2021, **104**(7), 8314–8325 [vid. 2022-03-10]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2020-18706
- [19] YANG, Jinchuan, Paul RAINVILLE, Kai LIU a Ben POINTER. Determination of lactose in low-lactose and lactose-free dairy products using LC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2021, **100**, 103824 [vid. 2022-03-10]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2021.103824

- [20] ČOPÍKOVÁ, Jana, J. MORAVCOVÁ, Z. WIMMER, L. OPLETAL, M. UHER, a P. DRAŠAR. Náhradní sladidla. *Chemické listy* [online]. 2013, (107), 867–874. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_11\\_867-874.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_11_867-874.pdf)
- [21] ANDERSON, G. Harvey. Sugars and health: A review. *Nutrition Research* [online]. 1997, **17**(9), 1485–1498 [vid. 2021-11-20]. ISSN 02715317. Dostupné z: [doi:10.1016/S0271-5317\(97\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(97)00139-5)
- [22] AUGUSTIN, L.S.A., C.W.C. KENDALL, D.J.A. JENKINS, W.C. WILLETT, A. ASTRUP, A.W. BARCLAY, I. BJÖRCK, J.C. BRAND-MILLER, F. BRIGHENTI, A.E. BUYKEN, A. CERIELLO, C. LA VECCHIA, G. LIVESEY, S. LIU, G. RICCARDI, S.W. RIZKALLA, J.L. SIEVENPIPER, A. TRICHOPOULOU, T.M.S. WOLEVER, S. BAER-SINNOTT a A. POLI. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* [online]. 2015, **25**(9), 795–815 [vid. 2021-11-20]. ISSN 09394753. Dostupné z: [doi:10.1016/j.numecd.2015.05.005](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2015.05.005)
- [23] ALHAREKY, Muhanad. Taxation of sugar-sweetened beverages and its impact on dental caries: A narrative review. *Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences* [online]. 2021, **9**(2), 113 [vid. 2022-03-05]. ISSN 1658-631X. Dostupné z: [doi:10.4103/sjmms.sjmms\\_54\\_21](https://doi.org/10.4103/sjmms.sjmms_54_21)
- [24] WEIHRAUCH, M.R. a V. DIEHL. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology* [online]. 2004, **15**(10), 1460–1465 [vid. 2021-11-20]. ISSN 09237534. Dostupné z: [doi:10.1093/annonc/mdh256](https://doi.org/10.1093/annonc/mdh256)
- [25] YEBRA-BIURRUN, M.C. SWEETENERS. In: *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2005 [vid. 2022-03-06], s. 562–572. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné z: [doi:10.1016/B0-12-369397-7/00610-5](https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00610-5)
- [26] DIVIŠ, Pavel, Zuzana JUREČKOVÁ, Milena VESPALCOVÁ, Jaromír POŘÍ-ZKA a Lenka PUNČOCHÁŘOVÁ. Simultaneous determination of sweeteners and preservatives in beverages by HPLC-DAD-ELSD. *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. 2020, **14**, 881–886 [vid. 2022-03-06]. ISSN 1337-0960. Dostupné z: [doi:10.5219/1339](https://doi.org/10.5219/1339)
- [27] PAVELKOVÁ, Kateřina. Přídavné látky povolené při výrobě potravin. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. 28. prosinec 2011. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/pridatne-latky-povolene-pri-vyrobe-potravin.aspx>
- [28] *Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1333/2008 o potravinářských přídavných látkách* [online]. 16. prosinec 2008. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=AZ&CP=02008R1333-20210808>

- [29] *Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin* [online]. 3. leden 2008. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4#prilohy>
- [30] *Vyhláška č. 253/2018 Sb., o požadavcích na extrakční rozpouštědla používaná při výrobě potravin* [online]. 30. říjen 2018. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-253/zneni-20181109>
- [31] CHAKRABORTY, Runu a Arpita DAS. Artificial Sweeteners. In: *Encyclopedia of Food Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2021-11-20], s. 30–34. ISBN 978-0-12-814045-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21619-3
- [32] MARCUS, Jacqueline B. Carbohydrate Basics: Sugars, Starches and Fibers in Foods and Health. In: *Culinary Nutrition* [online]. B.m.: Elsevier, 2013 [vid. 2021-11-20], s. 149–187. ISBN 978-0-12-391882-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-391882-6.00004-2
- [33] MORA, Margaux R. a Robin DANDO. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2021, **20**(2), 1554–1583 [vid. 2021-11-20]. ISSN 1541-4337, 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12703
- [34] Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States. *U. S. Food and Drug Administration* [online]. 2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>
- [35] SHAWKAT, Hany, Mei-Mei WESTWOOD a Andrew MORTIMER. Mannitol: a review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* [online]. 2012, **12**(2), 82–85 [vid. 2021-11-20]. ISSN 17431816. Dostupné z: doi:10.1093/bjaceaccp/mkr063
- [36] QIN, Yimin. Applications of Bioactive Seaweed Substances in Functional Food Products. In: *Bioactive Seaweeds for Food Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2021-11-20], s. 111–134. ISBN 978-0-12-813312-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813312-5.00006-6
- [37] Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): MANNITOL. *World Health Organization* [online]. 2021. Dostupné z: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=5119#>
- [38] FRIGAARD, Niels-Ulrik. Sugar and Sugar Alcohol Production in Genetically Modified Cyanobacteria. In: *Genetically Engineered Foods* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2021-11-20], s. 31–47. ISBN 978-0-12-811519-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811519-0.00002-9

- [39] RADELOFF, Michael A. a Roland H.F. BECK. Polyols – more than sweeteners. *Sugar Industry* [online]. 2013, 226–234 [vid. 2021-11-20]. ISSN 0344-8657. Dostupné z: doi:10.36961/si14095
- [40] Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): MALTITOL. *World Health Organization* [online]. 2021. Dostupné z: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4276>
- [41] SARAIVA, Ariana, Conrado CARRASCOSA, Dele RAHEEM, Fernando RAMOS a António RAPOSO. Maltitol: Analytical Determination Methods, Applications in the Food Industry, Metabolism and Health Impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2020, **17**(14), 5227 [vid. 2021-11-20]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph17145227
- [42] Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA): SORBITOL. *World Health Organization* [online]. 2021. Dostupné z: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=3018>
- [43] KONAR, Nevzat, Ibrahim PALABIYIK, Omer Said TOKER a Osman SAGDIC. Chewing gum: Production, quality parameters and opportunities for delivering bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, **55**, 29–38 [vid. 2022-05-14]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.07.003
- [44] IMFELD, T. Chewing Gum—Facts and Fiction: a Review of Gum-Chewing and Oral Health. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* [online]. 1999, **10**(3), 405–419 [vid. 2022-05-14]. ISSN 1045-4411, 1544-1113. Dostupné z: doi:10.1177/10454411990100030901
- [45] Mannitol, CID = 6251. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [online]. 2021. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6251>
- [46] Maltitol, CID = 493591. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [online]. 2021. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/493591>
- [47] Sorbitol, CID = 5780. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [online]. 2021. Dostupné z: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=5119#>
- [48] Xylitol, CID = 6912. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database*, [online]. 2021. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6912>

- [49] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, **28**(9), 1082–1102 [vid. 2021-11-20]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2009.06.008
- [50] MOTYKA, Kamil, Jan HLAVÁČ, UNIVERZITA PALACKÉHO, a PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA. *Stručný přehled separačních metod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [51] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [52] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celost. vysokošk. učebnice pro vys. školy chemickotechnologické*. Praha: SNTL, 1990. ISBN 978-80-03-00569-7.
- [53] HAMILTON, R. J. a P. A. SEWELL. Introduction to high performance liquid chromatography. In: R. J. HAMILTON a P. A. SEWELL, ed. *Introduction to high performance liquid chromatography* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1982 [vid. 2021-11-20], s. 1–12. ISBN 978-94-009-5940-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-5938-5\_1
- [54] DOUŠA, Michal. *HPLC.cz* [online]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [55] LUCENA, R., S. CÁRDENAS a M. VALCÁRCEL. Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **388**(8), 1663–1672 [vid. 2022-03-20]. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1344-6
- [56] BENSAKHRIA, Ayoub. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *ANALYTICAL TOXICOLOGY* [online]. 2017. Dostupné z: <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- [57] BALL, Stephen a Linda LLOYDS. *Agilent Hi-Plex Columns for Carbohydrates, Alcohols, and Acids* [online]. B.m.: Agilent Technologies, Inc. 30. červen 2011. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990--8264EN.pdf>
- [58] ČSN EN 15086 *Potraviný – Stanovení isomaltu, laktitolu, maltitolu, mannitolu, sorbitolu a xylitolu v potravinách* [online]. B.m.: Český normalizační institut. srpen 2006. Dostupné z: [http://csnonlinefirmy.agentura-cas.cz/html\\_nahledy/56/76265/76265\\_nahled.htm](http://csnonlinefirmy.agentura-cas.cz/html_nahledy/56/76265/76265_nahled.htm)
- [59] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům* [online]. 25. říjen 2011. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32011R1169>