



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL
PROTECTION

UMĚLÁ SLADIDLA A JEJICH PŘÍPADNÝ VLIV NA EKOSYSTÉM

ARTIFICIAL SWEETENERS AND THEIR POTENTIAL IMPACT ON THE
ECOSYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Kerberová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. Helena Zlámalová
Gargošová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1025/2016
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studentka: **Bc. Veronika Kerberová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Umělá sladidla a jejich případný vliv na ekosystém

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše mapující problematiku umělých sladidel, tj. míra jejich produkce, používání, výskyt v odpadních a povrchových vodách a případné environmentální dopady.
2. Na základě literárních poznatků budou vybrána ta sladidla, která nejsou zcela eliminována na čistírnách odpadních vod.
3. Tato budou testována prostřednictvím testů ekotoxicity na organismech akvatických ekosystémů, rovněž bude optimalizována analytická metoda pro jejich stanovení ve vodách.
4. Na základě zjištěných environmentálních hladin a výsledků ekotoxikologických testů bude posouzen vliv těchto látek na akvatický ekosystém.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Veronika Kerberová
studentka

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
vedoucí práce

doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením a ekotoxikologickým posouzením umělých sladidel. Práce byla zaměřena na nejčastěji používaná sladidla, mezi která patří acesulfam-K, cyklamát, sacharin a sukralosa. Tato sladidla byla analyzována metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, přičemž k jejich zakoncentrování byla použita metoda extrakce tuhou fází. Vzorky pro jejich stanovení byly odebírány z čistírny odpadních vod v Modřicích. Umělá sladidla jsou synteticky vyrobené látky, což je hlavní důvod jejich výskytu v odpadních vodách. Některá z nich nejsou s dostatečnou efektivností na čistírnách odstraněna, a pronikají tak do životního prostředí. Analýzou vzorků bylo zjištěno, že takovým sladidlem je sukralosa. Ekotoxikologický efekt výše zmíněných sladidel byl posuzován prostřednictvím organismů akvatického prostředí, konkrétně na sladkovodních korýších *Thamnocephalus platyurus* a *Daphnia magna*, dále na rostlině *Lemna minor* a baterie testů byla doplněna o zástupce destruentů, bakterii *Vibrio fischeri*. Pro všechna sladidla byly stanoveny hodnoty LC20, EC20 a IC20. Pro některá sladidla byly stanoveny také hodnoty LC50, EC50 a IC50. Testování prokázalo, že nejvyšší toxicitu představuje sacharin.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the determination and ecotoxicological assessment of artificial sweeteners. The diploma was focused on monitoring the most commonly used sweeteners, which includes acesulfam-K, cyclamate, saccharin and sucralose. These sweeteners were analyzed by liquid chromatography with mass spectrometry, using solid phase extraction for their concentration. The samples for their determination were taken from wastewater treatment plant in Modrice. Artificial sweeteners are synthetically produced substances, which is the main reason for their occurrence in waste water. Some of them are not efficiently removed from the wastewater treatment plant and penetrate into the environment. Analysis of the samples was found, that sucralose penetrates into the environment. The ecotoxicological effect of the sweeteners was evaluated via aquatic organisms, namely on the freshwater crustaceans *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, on the water plant *Lemna minor*, and the battery of tests was supplemented by a representative of the destructors *Vibrio fischeri*. For all sweeteners, LC20, EC20 and IC20 values were determined. For some sweeteners, LC50, EC50 and IC50 values were also determined. During testing, saccharin represented the highest toxicity.

KLÍČOVÁ SLOVA

sladidla, ekotoxikologie, akvatické testy, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

KEY WORDS

sweeteners, ecotoxicology, aquatic tests, liquid chromatography, mass spectrometry

KERBEROVÁ, V. *Umělá sladidla a jejich případný vliv na ekosystém*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 128 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za poskytnuté rady, ochotu a čas.

Mé poděkování patří také panu prof. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za pomoc a cenné připomínky při zpracování analytické části.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. Umělá sladidla	10
2.1.1. Historie	11
2.1.2. Použití.....	12
2.1.3. Zdravotní dopady umělých sladidel	13
2.2. Legislativa	15
2.3. Vybraná umělá sladidla	17
2.3.1. Acesulfam-K	17
2.3.2. Aspartam	18
2.3.1. Cyklamát	19
2.3.2. Sacharin.....	20
2.3.3. Sukralosa	21
2.3.4. Shrnutí základních údajů o umělých sladidlech	22
2.3.5. Přírodní sladidlo lékořice	22
2.4. Výskyt v životním prostředí	23
2.5. Umělá sladidla na čistírnách odpadních vod	25
2.5.1. Metody eliminace na čistírnách odpadních vod.....	25
2.6. Metody stanovení	27
2.6.1. Extrakce tuhou fází.....	27
2.6.2. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	28
2.6.3. Optimalizace metody.....	32
2.7. Ekotoxikologie.....	35
2.7.1. Hodnocení environmentálních rizik	35
2.7.1. Vztah mezi organismem a toxickou látkou	37
2.7.2. Ekotoxikologické biotesty	38
2.8. Vliv umělých sladidel na organismy akvatického prostředí.....	39
2.9. Ekotoxikologické testy na vodních organismech	43
2.9.1. Alternativní test toxicity na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i>	43
2.9.1. Akutní imobilizační test na perloočkách <i>Daphnia magna</i>	44
2.9.2. Test inhibice růstu okřehku <i>Lemna minor</i>	45

2.9.3. Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i>	46
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3. ANALÝZA UMĚLÝCH SLADIDEL	47
3.1. Použité přístroje a pomůcky	47
3.2. Použité chemikálie.....	47
3.3. Použité standardy.....	48
3.4. Použité plyny	48
3.5. Vzorkovaná lokalita.....	48
3.5.1. Odběr vzorků a jejich úprava	48
3.6. Optimalizace metody extrakce tuhou fází (SPE).....	49
3.7. Optimalizace separace	50
3.7.1. Optimalizace kapalinového chromatografu	50
3.7.2. Optimalizace LC/MS/MS.....	54
3.7.3. Analytické parametry	56
4. VÝSLEDKY A DISKUZE ANALYTICKÉ ČÁSTI.....	57
4.1. Optimalizace SPE.....	57
4.2. Optimalizace separace	61
4.3. Analytické parametry	62
4.4. Naměřené výsledky	63
5. EKOTOXIKOLOGICKÉ POSOUZENÍ.....	67
5.1. Alternativní test toxicity Thamnotoxkit F TM na organismu.....	67
<i>T. platyurus</i>	67
5.2. Alternativní test toxicity Daphtoxkit F TM na organismu <i>D. magna</i>	69
5.3. Test inhibice růstu okřehku menšího (<i>L. minor</i>)	71
5.4. Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi <i>V. fischeri</i>	72
6. VÝSLEDKY EKOTOXIKOLOGICKÉHO POSOUZENÍ	74
6.1. Alternativní test toxicity Thamnotoxkit F TM na organismu.....	74
<i>T. platyurus</i>	74
6.1.1. Referenční test s dichromanem draselným K ₂ Cr ₂ O ₇	74
6.1.2. Testování umělých sladidel.....	75
6.1.3. Shrnutí výsledků.....	78
6.2. Alternativní test toxicity Daphnotoxkit F TM na organismu	78
<i>D. magna</i>	78

6.2.1.	Referenční test s dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$	78
6.2.2.	Testování umělých sladidel.....	79
6.2.3.	Shrnutí výsledků.....	84
6.3.	Test inhibice růstu okřehku menšího (<i>L. minor</i>)	85
6.3.1.	Referenční test s dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$	85
6.3.2.	Testování umělých sladidel.....	86
6.3.3.	Shrnutí výsledků.....	88
6.4.	Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi bakterie <i>V. fischeri</i>	88
7.	DISKUZE VÝSLEDKŮ EKOTOXIKOLOGICKÉHO POSOUZENÍ.....	89
8.	ZÁVĚR.....	98
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	100
10.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	110
11.	SEZNAM PŘÍLOH	111

1. ÚVOD

Umělá sladidla jsou synteticky vyrobené látky, které nachází uplatnění především v potravinářském průmyslu jako přídatné látky, ve velké míře se také používají jako dochucovadla ve farmaceutickém průmyslu, například ve vitaminových doplncích. V potravinářském průmyslu se vyskytují v celé škále potravin a nápojů, od žvýkaček, různých druhů cukrovinek, přes marmelády, pudinky nebo jogurty, až po nápoje jako jsou džusy a ochucené vody.

Hlavním důvodem používání umělých sladidel je jejich sladivost, která je v některých případech až mnohonásobně vyšší než sladivost sacharosy, a tudíž jsou v konečném důsledku do potravin a nápojů přidávány v mnohem menším množství než v případě použití sacharosy. Další výhodou sladidel je, že nezvyšují kalorickou hodnotu potravin nebo pouze minimálně, čehož využívají lidé, kteří musí omezit příjem cukru.

Umělá sladidla představují velmi kontroverzní skupinu látek. Objevují se názory, které upozorňují na nebezpečnou stránku umělých sladidel – jejich konzumace může způsobovat problémy, jakými jsou bolesti hlavy, chronická únava až závažné nemoci jako je rakovina nebo Alzheimerova choroba. Také legislativa schvalování obnáší spoustu nejasností.

Mezi nejrozšířenější umělá sladidla patří acesulfam-K, aspartam, cyklamát a jeho soli, sacharin a sukralosa. Často se tato sladidla vyskytují i ve směsích, protože některá z nich vykazují kovovou pachut' a pro celkovou lepší chuť je vyžadováno spojení s jiným, chutnějším sladidlem. Vzhledem k nejasnosti vlivu sladidel na organismus se do popředí dostávají také přírodní sladidla jako stévie a z ní získaný steviosid a rebaudiosid, používaným přírodním sladidlem jsou i zpracované kořeny lékořice. I přesto se očekává, že spotřeba umělých sladidel každoročně poroste.

Jelikož se jedná o synteticky vyrobené látky, lidské tělo je buď metabolizuje pouze částečně, nebo dokonce vůbec, a jsou vylučována v nezměněné formě. Toto je jeden ze způsobů, jak se dostávají do odpadních vod a následně na čistírnu odpadních vod. Aktuální otázkou jsou jejich koncentrace na přítoku odpadních vod a na odtoku přečištěné vody do recipientu. Některá sladidla prochází čistírnou více méně v nezměněné formě, a tudíž pronikají do ekosystému. Umělá sladidla nejsou jedinými látkami, které jsou s nedostatečnou efektivitou na čistírnách odstraňovány, a tudíž nejsou ani jedinými látkami, které pronikají do životního prostředí a ovlivňují tak organismy. Takto se do životního prostředí dostávají látky, které pak při vzájemném působení mohou vykazovat synergický účinek.

V současnosti se předpokládá, že akutní toxicita sladidel pro organismy akvatického prostředí je poměrně nízká. Nicméně očekává se, že jejich spotřeba bude mít rostoucí trend, z čehož plyne, že se budou zvyšovat i koncentrace sladidel v ekosystému. K určení jejich vlivu na ekosystém je nutné zohlednit vliv na všech organismálních úrovních a vedle akutní toxicity sledovat také toxicitu chronickou.

V současné době jsou k dispozici metody, které spolehlivě stanovují sladidla v potravinách, ale pro stanovení sladidel jako kontaminantů životního prostředí zatím žádná standardní metoda není. K jejich stanovení se používá kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií a vzhledem k tomu, že se sladidla vyskytují v životním prostředí v nízkých koncentracích, je třeba zakoncentrování analytů, k čemuž se využívá extrakce tuhou fází.

Momentálně není v České republice k dispozici žádná veřejná studie, která by mapovala výskyt sladidel jak na přítoku odpadních vod, tak na odtoku přečištěné vody, čímž by bylo zjištěno, jaké koncentrace umělých sladidel pronikají do ekosystému.

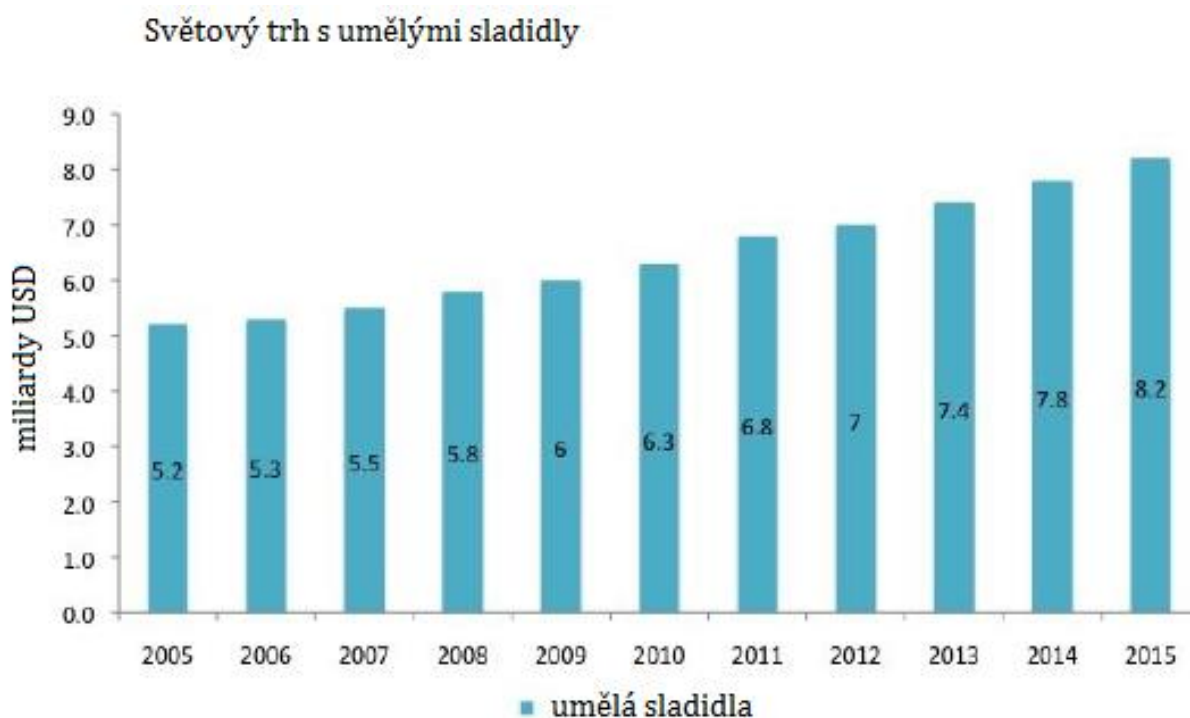
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Umělá sladidla

Mezi přirozené sladké složky potravin patří vesměs monosacharidy (především glukosa a fruktosa), disacharidy (sacharosa a laktosa), v menším množství také cukerné alkoholy (D-glucitol a D-mannitol) a další sloučeniny. Tyto látky se řadí mezi nutriční sladidla, protože jsou zdrojem energie, a tudíž mají určitou výživovou hodnotu. Mono a disacharidy patří mezi kariogenní látky, tj. látky, které podporují vznik zubního kazu. Mimo jiné je jejich nadměrný příjem spojován s obezitou a jinými nemocemi. Právě zdravotní, výživové ale i ekonomické aspekty vedly k vývoji mnoha syntetických látek. Některé z nich se vyznačují stejně sladkou chutí jako látky přírodní, zatímco druhou skupinu syntetických látek představují modifikované a čistě syntetické látky, které jsou charakterizované vyšší sladivostí než cukr [1].

Pod pojmem umělá sladidla (artificial sweeteners, AS) se rozumí takové látky, které jsou přidávány do potravin a jejichž funkcí je napodobení sladké chuti cukru. V porovnání se sacharosou jsou 30-13 000krát sladší. Právě velmi intenzivní sladká chuť umělých sladidel vede k tomu, že při přípravě potravin a nápojů jich není nutné použít taková množství jako v případě cukru [2; 3]. Globální trh týkající se umělých sladidel dosahuje hodnoty okolo 8,2 miliardy dolarů (USD), přičemž americký a evropský trh představují až 65 % z této hodnoty [4; 5].

Následující obrázek 1 zobrazuje stále rostoucí obrat na trhu s umělými sladidly:



Obrázek 1: Světový trh s umělými sladidly, upraveno dle [5]

V roce 2002 byl pozorován dramatický nárůst užívání AS, a to především z důvodu značného rozšíření používání sukralosu (schválené v roce 1999), která vykazuje v potravinách velmi dobrou stabilitu. K nárůstu přispěl i rozmach různých dietních programů, které jsou založeny právě na konzumaci potravin s nízkým obsahem cukru [6]. Cukr bývá v potravinách nahrazen i z důvodu celosvětově rostoucí míry obezity, s čímž je spojen i zvyšující se počet nemocí, jako je například *diabetes mellitus*. Lidé s touto nemocí musí omezit příjem cukru a dodržovat dietu. Průmyslové technologie se proto snaží objevovat i alternativní formy sladidel, které poskytují nízký až žádný příjem kalorií [2; 3]. Za další výhodu může být považován fakt, že při jejich konzumaci nedochází ke vzniku zubního kazu, protože se jedná pouze o náhrady cukru [7].

2.1.1. Historie

Prvenství mezi objevenými sladidly patří sacharinu. Byl objeven náhodou v roce 1879 chemickým výzkumným asistentem Constantinem Fahlbergem, který pracoval na nové konzervační látce a omylem si polil ruce právě používanými sloučeninami. Po příchodu domů si při chystání večeře všiml velmi intenzivní sladké chuti, proto se vrátil do laboratoře a zkoušel znovu syntetizovat onu sladkou látku. Vzniklou sloučeninu pojmenoval sacharin po latinském označení cukru *saccharum*. Sladidlo bylo používáno zprvu jen sporadicky, což se změnilo s příchodem první světové války, kdy byl cukr k dostání pouze na příděl. Používání sacharinu dramaticky vzrostlo i proto, že byl posílán jako sladidlo vojskům v Evropě. Sacharin se nepřestal používat ani po skončení první světové války, ba naopak množství výrobků na trhu významně vzrostlo. S příchodem druhé světové války se situace opakovala a došlo k výrazné expanzi výroby, která trvala opět i po jejím skončení. V roce 1960 byly provedeny studie, které ukázaly, že sacharin způsobil vznik rakoviny močového měchýře u laboratorních potkanů. Z tohoto důvodu Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) vydal rozhodnutí o omezení jeho používání, což zapříčinilo značné problémy, protože v té době byl sacharin jediné známé umělé sladidlo. V Kanadě v roce 1977 byl dokonce vydán zákaz toto sladidlo používat, nicméně Kongres vydal na tento zákaz moratorium, což umožnilo provádět další studie zkoumající jeho bezpečnost. V roce 1991 FDA zákaz používání zrušil na základě výsledků dokazujících, že sacharin (v běžném množství) u lidí rakovinu močového měchýře nezpůsobuje [8].

Dalším objeveným sladidlem byl v roce 1937 cyklamát, který je kvůli obavám z potenciálních karcinogenních účinků v USA zakázán, nicméně v Evropě je použití tohoto sladidla povolené [6].

Třetím známým umělým sladidlem v pořadí je aspartam. Byl objeven Jamesem Schlatterem v roce 1965. I k objevu tohoto sladidla přispěla náhoda, když J. Schlatter pracoval na syntéze nového léku k léčbě vředů a olízl si během své práce prsty, přičemž ho překvapila sladká chuť neznámé sloučeniny. Aspartam byl schválen v roce 1981 jako stolní sladidlo. Opět se vznesla vlna nesouhlasu, byly vydány mnohé studie, které poukazovaly na jeho nebezpečné vlastnosti [8]. Co se týká bezpečnosti aspartamu, názory se liší. Je uvedeno, že všechny studie financované průmyslem ručí za jeho bezpečnost, na rozdíl od nezávisle financovaných, kdy až 92 % těchto studií upozorňuje na nepříznivé účinky na zdraví. Uvádí, že produkty obsahující aspartam vyvolávají bolesti hlavy, mohou způsobovat Alzheimerovu chorobu, poruchy

pozornosti, vrozené vady, rakovinu, cukrovku a mnohé další. Přesto byl v roce 1996 schválen pro použití ve všech potravinách i nápojích [3].

V roce 1967 bylo objeveno další umělé sladidlo – acesulfam draselný. V roce 1992 bylo schváleno jeho použití v suchých potravinách a nakonec v roce 1998 bylo povoleno použití i v nápojích. Toto umělé sladidlo se chystala využívat i společnost Pepsi, která oznámila, že by mohl být používán v novém nápoji Pepsi One [8].

O rok později, tzn. v roce 1999, byla schválena sukralosa, která dnes představuje vůbec jedno z nejvíce používaných sladidel [6].

2.1.2. Použití

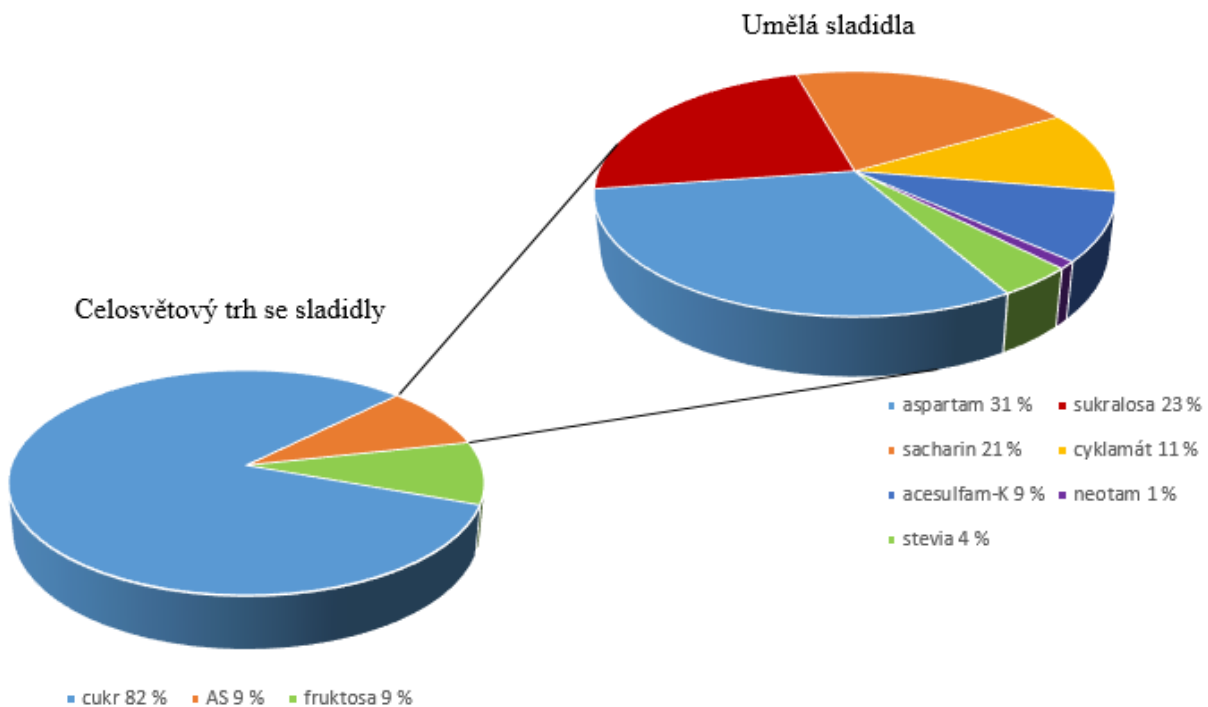
V dřívější době bylo používání umělých sladidel omezeno především na stolní sladidla a dietní nealkoholické nápoje. Nicméně v dnešní době je lze nalézt například i v obilných výrobcích, včetně chlebů a cereálií, v mléčných výrobcích bez cukru, v tzv. lite jogurtech, ve žvýkačkách a zmrzlínách bez přidaného cukru. Objevují se také v různých druzích koření, kečupů a džemů. Mohou se vyskytovat v multivitaminech a hygienických výrobcích, jako jsou ochucené zubní pasty či ústní vody. I přesto největší podíl spotřeby AS ve světě stále tvoří nápoje a různé dietní nápoje, které jsou následovány stolními sladidly a dále potravinami, které AS obsahují [6]. Umělá sladidla lze nalézt vyjma potravinářských produktů také ve výrobcích farmaceutického průmyslu a v řadě produktů osobní péče, např. v rtěnkách. Dokonce jsou využívána i v krmivech pro zvířata, přičemž Evropskou unií povoleným sladidlem je sacharin.

Potraviny s obsahem AS jsou levnější, protože není třeba nákladná produkce sacharosy. Další výhodou je, že dochází i k prodloužení trvanlivosti potravin [4; 9].

Některá sladidla, jako například alimát nebo cyklamát, nejsou v USA povolena, ale v mnoha částech světa jsou jak schválena, tak běžně používána. Právě cyklamát společně s aspartamem, sacharinem a sukralosou tvoří většinu z celkové spotřeby AS, především kvůli své nízké ceně. Vzhledem k níže uváděným zdravotním aspektům používání AS jsou dnes čím dál více preferovány přírodní produkty, přičemž k nejvíce používaným přírodním nízkokalorickým sladidlům patří stevie a rebaudiosid A [6].

V dnešní době patří mezi nejvíce používaná umělá sladidla acesulfam-K (ACE), alimát (ALI), aspartam (ASP), cyklamát (CYC), neohesperidin dihydrochalkon (NHDC), neotam (NEO), sacharin (SAC) a sukralosa (SUC) [4].

Následující obrázek 2 zobrazuje poměrové zastoupení použití jednotlivých sladidel:



Obrázek 2: Používaná sladidla, upraveno dle [5]

V dostupné literatuře lze nalézt i mnoho průzkumů, které zkoumají a zjišťují, jaké věkové skupiny jsou největšími spotřebiteli, zda převažují ženy či muži, nebo jak se tyto zjištěné informace mění v průběhu let. V porovnání věkových skupin spotřebitelů jsou nejčastějšími uživateli umělých sladidel děti (6-11 let) a starší lidé (> 55 let). Bylo prokázáno, že mnohem větší nárůst spotřeby v minulých deseti letech byl pozorován u žen, ale v současné době je spotřeba mezi muži a ženami přibližně vyrovnaná [6].

2.1.3. Zdravotní dopady umělých sladidel

Z důvodu velmi dobré dostupnosti AS se očekává, že jejich využití stále poroste, s čímž souvisí i rostoucí obavy, které se týkají zdravotní závadnosti umělých sladidel a produktů umělá sladidla obsahujících. Právě zdravotní dopady (kladné i záporné) jsou velmi často rozebíranou problematikou [6]. Mnoho lidí se obává, že umělá sladidla mohou způsobovat rakovinu a jiné nemoci. Objevují se názory, že mohou být příčinou bolestí hlavy, chronické únavy, autismu, sklerózy, Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci, leukémie, vzniku lymfomů, popř. rakoviny močového měchýře a mozku [10]. Bylo provedeno již mnoho studií zabývajících se zdravotními důsledky konzumace potravin s obsahem umělých sladidel, výsledky jsou však odlišné a rozporuplné.

Mezi spotřebiteli je pravděpodobně nejdiskutovanějším sladidlem aspartam. Ten se v lidském těle rozkládá na amino kyselinu, kyselinu asparagovou a methylester fenylalaninu, ze kterého v malém množství vzniká methanol. O methanolu je známo, že ve větších dávkách působí na lidský organismus toxicky. Nicméně produkty rozkladu aspartamu se vyskytují v mnoha jiných a běžných potravinách, jako je maso, mléko nebo ovocné šťávy. Například sklenice mléka obsahuje asi 6x více fenylalaninu a až 13x více kyseliny asparagové nebo sklenice rajčatové šťávy obsahuje zhruba 6x více methanolu, než je odpovídající množství nápoje slazeného aspartamem.

Byla uskutečněna studie se zvířaty, na kterých byly provedeny testy z hlediska akutní, subchronické a chronické toxicity, dále karcinogenity, teratogenity, mutagenity, a také byly hodnoceny účinky na nervový systém, gastrointestinální trakt, endokrinní systém a reprodukční systém. Všechny testovací organismy byly vystaveny mnohem větším dávkám, než by byli lidé schopni zkonsumovat. Na základě testů byla stanovena hodnota NOEL (No Observed Effect Level, nejvyšší dávka bez pozorovaného účinku) na 4 000 mg/kg tělesné hmotnosti za den, což je mnohonásobně vyšší hodnota než stanovený přijatelný denní příjem (Acceptable Daily Intake, ADI, viz níže) [11; 12].

Donedávna převládaly názory, že umělá sladidla jsou zdravé náhražky cukru, protože poskytují sladkou chuť bez příjmu kalorií nebo glykemických účinků, nicméně úloha AS ve zdravé stravě je diskutabilní. Údaje z několika epidemiologických studií ukazují, že spotřeba AS je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje obezity a diabetu 2. typu. Také se objevují názory, že konzumace AS s cílem zhubnout je kontraproduktivní, protože umělá sladidla mohou vyvolávat chuť k jídlu, a tudíž může docházet k příjmu dalších potravin a kalorií [13; 14].

Vědci z Purdue University v USA prováděli testy umělých sladidel s využitím krys jako testovacího organismu. Pozorovali vztah mezi expozicí AS a konzumací potravy, kdy sledovaným endpointem byla změna hmotnosti krys. Pro test byly vybrány dvě skupiny krys. První skupině byly podávány ke krmivu dvě různé tekutiny – jedna obsahovala sacharin a druhá glukosu, tzn.: tekutina ne vždy představovala příjem kalorií. Ve druhé testovací skupině krys přijímaly opět dvě různé tekutiny, přičemž první z nich obsahovala sacharosu a druhá glukosu, tzn.: tekutina vždy představovala určitý kalorický příjem. Po uplynutí deseti dnů krysy dostaly slazené krmivo a byla sledována jeho spotřeba po dobu 1 hodiny. Skupina, která měla ve své potravě tekutinu obsahující umělé sladidlo sacharin, vykazovala až 4x větší spotřebu krmiva [15].

Další test byl proveden s umělým sladidlem komerčně označeným jako Splenda (sukralosa). Testovacími organismy byly 4 skupiny dospělých krys, které po dobu 12 týdnů přijímaly vodu obsahující různé koncentrace sukralosy (v rozsahu 100 až 1000 mg/l/den). Po uplynutí této doby se hodnotila jejich hmotnost v porovnání s kontrolní skupinou. Zjistilo se, že všechny skupiny vystavené expozici AS vykazovaly vyšší váhu v porovnání s kontrolou, přičemž tyto rozdíly byly významné pro koncentrace 100 a 500 mg/l/den [15].

Tento trend byl sledován i u lidí již v roce 1986, kdy byl proveden průzkum, do kterého se zapojilo 78 694 žen po dobu jednoho roku. Na konci tohoto roku se ukázalo, že ženy užívající sacharin vykazovaly příbytek na váze oproti ženám, které se umělým sladidlům vyhýbaly [15].

Jedním z hlavních cílů zkoumání důsledků AS je sledování změny hmotnosti testovacích organismů, protože se jedná o nejlépe pozorovatelnou změnu. Předpokládá se, že pokud může docházet ke změně hmotnosti testovacích organismů, mohou AS způsobovat i jiné, závažnější zdravotní následky [15].

Na obrázku 3 jsou porovnávány hlavní zdravotní výhody a nevýhody přírodních a umělých sladidel:



Obrázek 3: Zdravotní výhody a nevýhody sladidel, upraveno dle [104]

2.2. Legislativa

Česká republika je součástí Evropské unie, a proto musí do své legislativy zapracovávat i předpisy vydané EU. Problematiku umělých sladidel upravuje směrnice Evropského parlamentu a Rady 94/35/ES ze dne 30. června 1994 o náhradních sladidlech pro použití v potravinách, která byla novelizována v roce 2006 směrnicí 2006/52/ES. V České republice upravuje problematiku umělých sladidel vyhláška č. 4/2008 Sb., která stanovuje druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Ta byla novelizována vyhláškou č. 122/2011 Sb. Z dané vyhlášky vyplývá, že přídatné látky lze použít při přípravě potravin, jen pokud mají své technologické opodstatnění a je to pro danou potravinu povoleno. V příloze č. 5 vyhlášky č. 4/2008 Sb. je uveden seznam povolených sladidel a jejich nejvyšší povolená množství v potravinách [16; 17; 18].

Všechna schvalovaná umělá sladidla musí podstoupit mnoho testování. Při procesu schvalování musí výrobce poskytnout rozsáhlé údaje včetně názvu, složení, fyzikálních a chemických vlastností a dále musí dodat komplexní zprávy o testování bezpečnosti. V Americe problematiku sladidel řeší Úřad pro kontrolu potravin a léčiv FDA, který nemůže schválit žádnou potravinovou složku, pokud není prokázáno, že je bezpečná [19]. V Evropské unii dříve odpovídal za bezpečnost potravinových přídatných látek Vědecký výbor pro potraviny (Scientific Committee on Food, SCF), v současné době ovšem nese zodpovědnost Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA). Všem povoleným sladidlům je přidělena hodnota ADI. ADI je definováno jako množství přídatné látky, vyjádřené v mg/kg tělesné hmotnosti, které může být požit denně po celý život bez zdravotního rizika. Pro umělá sladidla se ADI pohybuje v rozmezí hodnot 5-50 mg/kg tělesné hmotnosti za den [20; 21].

Ve státech Evropské unie jsou povolena tato následující sladidla: acesulfam-K (E950), aspartam (E951), cyklamát a jeho soli (E952), sacharin (E954), sukralosa (E955), thaumatin (E957), neohesperidin DC (E959), neotam (E961) a aspartamacesulfam a jeho sodná sůl (E962) [17; 18].

Na synteticky vyrobené látky se vztahuje nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of chemicals, REACH). REACH je legislativní dokument, který si klade za cíl zlepšit ochranu lidského zdraví a životního prostředí skrze efektivnější identifikaci chemických látek. Úkolem Nařízení REACH je stanovit postupy pro shromažďování a hodnocení údajů o vlastnostech a rizicích látek a zavést jejich systematickou registraci. Samotná registrace má dokumentovat bezpečné používání chemických látek, proto musí zahrnovat i informace o jejich nebezpečnosti, na základě kterých mohou žadatelé o registraci tyto látky klasifikovat. Zároveň Nařízení REACH zlepšuje kontrolu jednotlivých látek. Cílem postupu povolování je zajistit, aby látky vzbuzující mimořádné obavy byly primárně pod kontrolou, sekundárně je snaha o jejich nahrazení vhodnou alternativou. Implementaci Nařízení v České republice má v kompetenci Ministerstvo životního prostředí, jeho uplatňování pak kontroluje Česká inspekce životního prostředí [22; 23; 24; 25].

Existují výjimky z některých částí právních předpisů, pro které platí předpisy jiné. Těmito výjimkami jsou např. chemické látky v potravinách nebo v léčivých přípravcích. Dále to mohou být skupiny látek, které jsou z působnosti nařízení výslovně vyloučeny. To se týká látek používaných v potravinách a krmivech, což jsou aditiva a aroma. Z této informace vyplývá, že umělá sladidla jakožto synteticky vyrobené látky pod Nařízením REACH nespádají [26].

2.3. Vybraná umělá sladidla

2.3.1. Acesulfam-K

<u>Strukturní vzorec:</u>	C ₄ H ₄ KNO ₄ S
<u>Chemický název:</u>	draselná sůl 6-methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-on-2,2-dioxidu
<u>Molekulová hmotnost:</u>	201,24 g/mol



Obrázek 4: Acesulfam-K [100]

Acesulfam-K byl objeven v roce 1967 Karlem Claussem. Nejprve byl ve Spojených státech schválen jen pro specifické použití a až v roce 1998 se začal využívat i ke slazení nápojů ve směsi s aspartamem. Roku 2003 byl schválen k používání v celém rozsahu produktů potravinářského průmyslu [9].

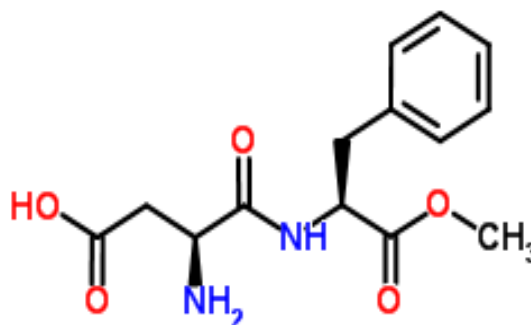
Vyskytuje se ve více než 100 zemích a ve více než v 5 000 produktech. Komerčně je k dostání pod označením Sunette, Sweet One nebo Swiss Sweet. Díky tepelné stabilitě může být používán při vaření i pečení. Vzhledem k tomu, že sám o sobě má nepříjemnou chuť, nachází se častěji ve směsích s ostatními sladidly. Je kombinován převážně s aspartamem nebo sukralosou. Běžně se používá ve spojení s objemovými sladidly jako je sorbitol, např. v marmeládách, dezertech, pečivu nebo žvýkačkách. Je vhodný pro všechny obvyklé oblasti použití sladidel [3; 27].

Acesulfam-K je umělé sladidlo, které je zhruba 200krát sladší než cukr. Jeho sladká chuť je vnímána rychle – má okamžitý nástup sladkosti ve srovnání s ostatními sladidly a nepřetrvává déle, než je chuť potravin. Hodnota ADI byla stanovena na 15 mg/kg, ale v roce 2000 byla snížena na 9 mg/kg lidské hmotnosti za den. Z lidského těla je vylučován prakticky v nezměněné formě. Přestože je spolu s cyklamátem a sacharinem považován za bezpečnou látku, u části odborníků stále přetrvávají obavy ohledně jeho zdravotní nezávadnosti, a proto je předmětem dalšího toxikologického prověřování.

Z chemického hlediska se jedná o bílý krystalický prášek, který má podobné vlastnosti jako sacharin. Při obvyklých teplotách je stálý, začíná se rozkládat až při teplotě 225 °C. S rostoucí teplotou prudce stoupá také jeho rozpustnost, naopak v alkoholech je rozpustný mnohem méně. Jeho stabilita byla zkoumána porovnáním vlastností vzorků acesulfamu-K skladovaného po dobu šesti let při pokojové teplotě a nově vyrobeného. Při tomto testu nebyly pozorovány žádné významné rozdíly [27; 28; 29].

2.3.2. Aspartam

<u>Strukturní vzorec:</u>	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅
<u>Chemický název:</u>	methyl ester L- α -aspartyl-L-fenylalaninu
<u>Molekulová hmotnost:</u>	294,30



Obrázek 5: Aspartam [97]

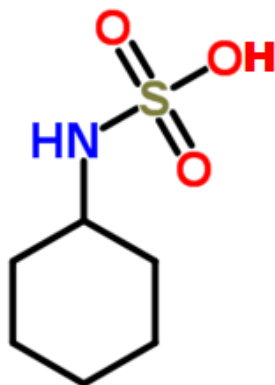
Aspartam je využíván více než 30 let a pravděpodobně patří mezi nejvíce kontroverzní sladidla vůbec. S procesem jeho povolení je spojeno mnoho nejasností. I když je na něj nahlíženo díky mnoha nežádoucím účinkům jako na škodlivou látku, žádné studie spolehlivě neprokázaly jeho nebezpečné vlastnosti. Hodnota ADI se v USA a Evropě liší, zatímco v USA je stanovena na 50 mg/kg tělesné hmotnosti, v Evropě je tato hodnota nižší – 40 mg/kg tělesné hmotnosti [30]. V roce 2002 SCF provedl revizi všech původních i novějších poznatků týkajících se zdravotních následků a rozhodl, že hodnotu ADI není třeba měnit.

Představuje nejvíce prodávané umělé sladidlo na světě a je používáno ve více než 6 000 produktech. Jeho nejznámější označení na trhu je Nutra Sweet. Je 200krát sladší než sacharosa a jeho chuť je jí velmi podobná. Uvádí se, že nemá kovovou pachut', jak tomu je u některých ostatních sladidel. Používá se jako sladidlo v mnoha produktech, např. ve žvýkačkách, v suchých nápojových směsích, instantní káve a čajích, dále v některých jogurtech, pudincích, zmrzlinách nebo různých cukrovinkách [3]. Jeho použití není vhodné k pečení a vaření vzhledem k nízké stabilitě, kterou vykazuje při delším zahřívání. V lidském těle je velmi rychle vstřebáván a metabolizován, mimo jiné i za vzniku malého množství methanolu (10 %). Toto sladidlo nemohou užívat lidé, kteří trpí fenylketonurií, což je onemocnění způsobené neschopností metabolizovat fenylalanin.

Aspartam je dipeptid složený ze dvou aminokyselin – L-asparagové a methyl esteru L-fenylalaninu. Ve vodě je velmi málo rozpustný, v tucích a olejích není rozpustný vůbec a v alkoholech jen částečně. V pevné formě je relativně stabilní, ale v závislosti na pH a teplotě podléhá degradaci. K jeho transformaci dochází při zvýšené teplotě, cca od 60 °C. Při laboratorní teplotě je aspartam stabilní v rozmezí hodnot pH 3,4-5. Při nižším pH (pH < 3) podléhá hydrolýze, jejímž produktem je aspartylfenylalanin. Pokud je pH > 6 dochází k jeho cyklizaci [9; 20; 28; 31].

2.3.1. Cyklamát

<u>Strukturní vzorec:</u>	C ₆ H ₁₂ NO ₃ S
<u>Chemický název:</u>	aminocyklohexylsulfamát
<u>Molekulová hmotnost:</u>	179,24



Obrázek 6: Cyklamát [99]

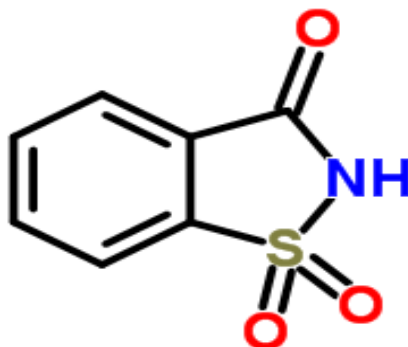
Cyklamová (cyklohexylsulfamová) kyselina a její soli (natrium cyklamát a kalcium cyklamát) se řadí pod skupinový název cyklamáty. V mnoha státech nejsou povoleny [1], například FDA zakázal použití cyklamátu jako přídatné látky v roce 1969 z důvodu karcinogenních vlastností, které se projevovaly při testování tohoto AS ve směsi se sacharinem. Vědci zjistili, že v lidském těle může docházet k metabolizaci za vzniku cyklohexylaminu. Cyklohexylamin je toxická látka, která má schopnost rychlé a kompletní absorpce v gastrointestinálním traktu. Může také docházet k metabolizaci za vzniku dicyklohexylaminu, který je karcinogenní. V současné době převládá tvrzení, že cyklamáty nezpůsobují rakovinu přímo, ale s velkou pravděpodobností potencují účinek jiných karcinogenních látek, proto se jeho konzumace nedoporučuje těhotným ženám a dětem. V lidském těle je metabolizován zhruba z 60 %. Po toxikologickém hodnocení byla stanovena hodnota ADI na 7 mg/kg tělesné hmotnosti [28; 32; 33].

Oblast použití je široká a v podstatě stejná jako u ostatních výše zmíněných sladidel. Může se vyskytovat v nápojích, jako jsou džusy a různé šťávy, dále v potravinářském průmyslu ve žvýkačkách, v cukroví a džemech, želatinách či v různých druzích dresingů a topingů. Bývá používán ve farmaceutickém průmyslu jako dochucovadlo. Stejně jako acesulfam-K je charakterizován rychlým nástupem chuti, krátkým trváním, hořkou a kovovou pachutí. Vykazuje nejnižší sladivost – je pouze 30x sladší než cukr, ale ve směsích s jinými sladidly dochází k synergickému efektu. Sladká chuť závisí na typu soli a použitém médiu, proto se může sladkost v mnoha produktech lišit. Je zajímavé, že u tohoto sladidla se vzrůstající koncentrací klesá sladkost. Je převážně používán ve formě solí kvůli jejich vyšší rozpustnosti ve vodě.

V pevné formě je cyklamát bílý krystalický prášek s velmi dlouhou životností. Je stabilní v širokém rozsahu pH, v případě nižších i vyšších teplot, v přítomnosti světla, kyslíku i jiných potravinových složek. Mimo jiné je známo, že nepodporuje růst bakterií či plísní [20; 34].

2.3.2. Sacharin

<u>Sumární vzorec:</u>	C ₇ H ₅ NO ₃ S
<u>Chemický název:</u>	2,3-dihydro-3-oxobenzisosulfonazol
<u>Molekulová hmotnost:</u>	183,18



Obrázek 7: Sacharin [98]

Sacharin se vyrábí od roku 1901 a rovněž i u tohoto sladidla se objevují pochyby o jeho zdravotních dopadech. Je velmi stabilní, a představuje tak sladidlo, které může být použito univerzálně v mnoha potravinářských výrobcích i pro přímou konzumaci. Kvůli poněkud hořké až kovové chuti se sacharin nejčastěji používá v kombinaci s jinými sladidly, například jeho sodná sůl je nejčastěji kombinována s cyklamátem. Lidským organismem není metabolizován, a tudíž je beze změny vylučován převážně močí [33]. V komerční formě je dostupný ve třech variantách: sacharin, sacharin sodný a sacharin vápenatý. Tyto formy jsou 200-800krát sladší než sacharosa a neobsahují žádné kalorie. SCF v roce 1995 stanovil hodnotu ADI na 5 mg/kg tělesné hmotnosti, ovšem v Americe byla hodnota ADI schválena na 15 mg/kg tělesné hmotnosti. Ze všech aktuálně prodávaných sladidel je díky nízké ceně a intenzivní sladkosti nákladově nejvýhodnější [28; 35; 36].

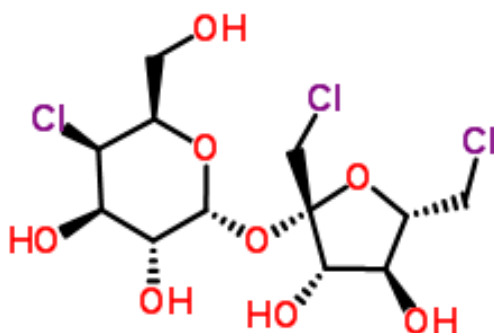
Sacharin má ze všech sladidel nejširší oblast využití, lze ho nalézt v celé řadě produktů, jakými jsou nealkoholické nápoje, ovocné šťávy, džusy, žvýkačky, různé cukrovinky, kandované ovoce, džemy, polevy a omáčky. Mimo jiné nachází uplatnění i v zemědělských produktech, v krmivech pro zvířata, v mnoha produktech osobní péče a ve farmacii.

Z chemického hlediska je to bílý krystalický prášek bez zápachu. Jedná se o středně silnou kyselinu vykazující nízkou rozpustnost ve vodě (maximálně 40 g/l vody při teplotě 100 °C), což ale nebrání velmi širokému využití právě díky jeho sladkosti. Nejpoužívanější je sodná sůl sacharinu, protože představuje nejvíce rozpustnou formu a má vysokou míru stability. Výhodou sacharinu a jeho solí je vysoká stabilita ve vodných roztocích v širokém rozsahu pH. Studie prokázaly, že v rozmezí pH 3,3-8,0 nedocházelo ke změnám ani při zahřívání na teplotu 150 °C po dobu jedné hodiny. K hydrolýze dochází při vysoké teplotě a zároveň nízké nebo naopak vysoké hodnotě pH. Produkty hydrolýzy jsou 2-sulfobenzoová a 2-sulfamoylbenzoová kyselina [28; 29].

I když souhrn dostupných výzkumů předpokládá, že sacharin je pro lidskou spotřebu bezpečný, objevují se negativní názory, které se týkají jeho zdravotních dopadů. Tyto názory se opíraly o výsledky testů na krysách. Během těchto testů vědci prokázali, že pokud krysy byly vystaveny vysokým dávkám sodné soli sacharinu, docházelo ke vzniku nádorů v močovém měchýři [28]. Velké dávky způsobily vznik sraženiny fosforečnanu vápenatého a při dlouhodobějším podávání pak s velkou pravděpodobností podnítily vznik nádorů. Tento vliv je ale pozorován i u jiných sodných solí a navíc je prokázáno, že krysy jsou zvláště náchylné ke vzniku nádorů v močovém měchýři [33]. V roce 1997 zvláštní Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) vydala prohlášení, že studie prokazující vznik nádorů u krys nejsou pro člověka relevantní [28].

2.3.3. Sukralosa

<u>Strukturní vzorec:</u>	$C_{12}H_{19}Cl_3O_8$
<u>Chemický název:</u>	1,6-dichlor-1,6-dideoxy- β -D-fruktofuranosyl-4-chlor-4-deoxy- α -D-galaktopyranosid
<u>Molekulová hmotnost:</u>	397,63 g/mol



Obrázek 8: Sukralosa [101]

Sukralosu lze nalézt v mnoha produktech (cca 4 000) a je používána ve více než 80 zemích. Byla objevena v roce 1976 a k jejímu schválení FDA došlo v roce 1998, kdy se na trhu začala objevovat pod obchodním názvem Splenda. Studie prokazují, že je chuťově nejvíce podobná stolnímu cukru a její sladivost je zhruba 600krát větší. Přijatelná denní dávka byla stanovena na 15 mg/kg tělesné hmotnosti za den – tato hodnota platí v Evropě. V Americe je schválená hodnota nižší, a to 5 mg/kg tělesné hmotnosti.

Je široce využívána a upřednostňována před ostatními umělými sladidly, protože nemá hořkou pachut', kterou některá jiná umělá sladidla vykazují. Její bezpečnost byla předmětem přísného a rozsáhlého průzkumu, proces jejího zkoumání se dokonce řadí mezi jeden z největších výzkumných programů pro vyšetřování nových aditiv. Mnohé toxikologické studie na různých druzích zvířat ukazují, že nebyly doposud prokázány karcinogenní, teratogenní ani mutagenní účinky [3; 4; 37; 38]. Jedná se o substituovaný disacharid, který je syntetizován selektivní chlorací tří primárních hydroxylových skupin v molekule cukru.

Po vložení tří atomů chloru do molekuly sacharosu se nově vzniklá molekula prostorově změní, a tudíž ji enzymy nedokáží rozložit, tzn. většina sukralosu (zhruba 85 %) se nevstřebává, ale je z lidského těla vylučována v nezměněné formě [37].

Po fyzikálně-chemické stránce se jedná o bílý krystalický prášek bez zápachu a s vysokým bodem tání. Sukralosa je amfifilní molekula, která se skládá z hydrofobních skupin (C-CH₂Cl) jakož i z hydrofilních skupin (OH), z čehož plyne, že může mít jak lipofilní, tak hydrofilní vlastnosti. Jako disacharid má relativně malou molekulovou hmotnost a díky přítomnosti hydroxylových skupin je vysoce rozpustná ve vodě. Nízký rozdělovací koeficient oktanol-voda spojený s přítomností více OH skupin na chlorované molekule naznačuje nízký bioakumulační potenciál. Za velmi kyselých podmínek pomalu hydrolyzuje za vzniku 1,6-dichlorofruktosu a 4-chlorogalaktosu, což je v přírodních podmínkách jen málo pravděpodobné [28; 31].

2.3.4. Shrnutí základních údajů o umělých sladidlech

V tabulce 1 jsou uvedeny základní informace o zájmových sladidlech.

Tabulka 1: Přehled umělých sladidel a jejich základní údaje

sladidlo	strukturní vzorec	molekulová hmotnost	označení	sladivost	ADI
acesulfam-K	C ₄ H ₄ KNO ₄ S	201,24	E950	200	9
aspartam	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	294,30	E951	180-200	40
cyklamát	C ₆ H ₁₂ NO ₃ S	179,24	E952	30	7
sacharin	C ₇ H ₅ NO ₃ S	183,18	E954	200-800	5
sukralosa	C ₁₂ H ₁₉ Cl ₃ O ₈	397,63	E955	600	15

2.3.5. Přírodní sladidlo lékořice

Rod *Glycyrrhiza* obsahuje okolo 30 druhů rostlin rozšířených po celém světě. Z těchto rostlin jsou zpracovávány kořeny a rhizomy, ze kterých se postupnými úpravami, jako je sušení nebo drcení, získávají různé formy (extrakt, prášek), které jsou nadále využívány. Právě extrakt z kořenů a oddenků těchto rostlin patří k nejstarším a nejčastěji používaným bylinným lékům na světě. Pro komerční použití se z pravidla využívají následující tři druhy rostlin: *Glycyrrhiza glabra*, která je obvykle pěstována v Evropě, proto je často nazývána jako Lékořice evropská, dále *Glycyrrhiza uralensis* a *Glycyrrhiza inflata*, přičemž tyto dva druhy jsou často používány v čínské medicíně, proto se označují jako Lékořice čínská. Jako sladidlo je přidávána do žvýkaček, čokoládových sladkostí, žvýkacích tabáků, cigaret a různých směsí určených ke kouření. Uplatňuje se i v kosmetice jako depigmentační činidlo.

Z kořenů a oddenků lékořice byl izolován velký počet sloučenin jako triterpeny, saponiny, isoflavonoidy a chalkony. Za hlavní biologickou složku je považován glycyrrhizin (5-10 %), který je až 50x sladší než cukr. Složení lékořice se často liší především v závislosti na zeměpisném původu a způsobu zpracování, s čímž přímo souvisí kvalita výsledného produktu [39; 40].

Extrakt z kořenů lékořice je tradiční lék, který se používá především pro léčbu hepatitidy C a plicních a kožních onemocněních, mimo jiné je prokázáno, že má antimikrobiální, antioxidační a protinádorové účinky. Konzumace lékořice nebo přípravků, které ji obsahují, ve velkém množství může způsobovat bolest hlavy, paralýzu, dočasnou ztrátu zraku, dále kardiovaskulární poruchy, srdeční zástavu, ovlivňovat správnou činnost ledvin a další [40].

Hodnota ADI pro glycyrrhizin nebyla stanovena, ale z dostupných údajů vyplývá, že příjem 100 mg/den (cca 2 mg/kg/den) nebude představovat nepříznivé účinky. Nicméně, výbor JECFA připouští, že u více citlivých jedinců může být tato hodnota nižší [41].

2.4. Výskyt v životním prostředí

Při hodnocení výskytu umělých sladidel v životním prostředí je v oblasti zájmu primárně acesulfam-K, cyklamát, sacharin a sukralosa. Tato AS jsou vybrána především ze dvou důvodů. Prvním důvodem jsou částečné nebo omezené možnosti jejich odstranění na čistírnách odpadních vod. Druhou příčinou jsou jejich poměrně vysoké koncentrace stanovené v akvatickém prostředí. Sladidla jsou detekována po celém světě v různých složkách životního prostředí, přesto zatím neexistují žádné předpisy, které by nařizovaly jejich sledování. Problémem je nedostatek informací o jejich distribuci v životním prostředí, s čímž souvisí i málo informací o případných ekotoxikologických vlivech [4; 42].

Umělá sladidla se do životního prostředí dostávají prostřednictvím lidské spotřeby nízkokalorických nápojů, potravin a dalších produktů a jejich následného vylučování. Je prokázáno, že velké procento ACE, CYC, SAC a SUC je vylučováno v nezměněné formě, zatímco ASP, ALI, NEO a NHDC jsou v lidském těle z většiny degradovány. Tímto způsobem se umělá sladidla dostanou do odpadních vod přiváděných na čistírnu odpadních vod, kde jsou vystavena čistícím procesům. Některá sladidla jsou ve velkém množství odstraněna, ovšem některá jsou schopna projít technologií ČOV více méně beze změny. Mezi špatně odbouratelná sladidla patří acesulfam-K a sukralosa [4; 43].

Environmentální hladiny umělých sladidel jsou závislé na míře jejich používání v jednotlivých zemích i na typu sladidla. Například ve Švýcarsku a v Německu byly naměřeny koncentrace sukralosy a acesulfamu-K v povrchových vodách v řádech $\mu\text{g/l}$, zatímco pro sladidla, která jsou na čistírnách lépe odstranitelná (sacharin a cyklamát), jsou obvykle nižší. V Evropě se koncentrace AS na přítoku pohybují okolo $100 \mu\text{g/l}$, přičemž na odtoku z ČOV jsou tyto koncentrace sníženy. Například průměrné koncentrace sukralosy na odtoku se pohybují v rozsahu $0,71\text{--}11 \mu\text{g/l}$ [42; 44].

Problematika úspěšnosti odstraňování AS na ČOV je v poslední době velmi diskutována. Například v Německu byla provedena studie, která zjišťovala obsah AS na dvou čistírnách odpadních vod, přičemž koncentrace umělých sladidel (v $\mu\text{g/l}$) na přítoku byly na obou čistírnách velmi podobné. První z čistíren se nachází ve městě Eggenstein-Leopoldshafen a představuje konvenční mechanicko-biologickou čistírnu s kapacitou 20 000 EO (ekvivalentních obyvatel) a průtokem 2 500 až 3 000 m^3/den . Na tuto čistírnu je připojeno okolo 15 000 obyvatel. Druhá čistírna, ve městě Karlshure, má kapacitu 875 000 EO, je na ni připojeno cca 350 000 obyvatel a průtok vody je 96 000 m^3/den . Na této čistírně je aplikován

mechanický stupeň čištění se srážením fosforu následován biologickým stupněm čištění. Výsledky této studie ukázaly, že na přítoku odpadních vod byla průměrná koncentrace cyklamátu 190 µg/l, sacharinu a acesulfamu-K po 40 µg/l a sukralosy méně než 1µg/l. Dále byla zkoumána účinnost čištění. Z výsledků vyplynulo, že SAC a CYC byly eliminovány z více než 94 %, naopak ACE a SUC byly eliminovány jen ve velmi malém množství, a proto mohou být nalezeny v povrchových, podzemních i pitných vodách v koncentracích pohybujících se řádově v µg/l [42; 45].

Tyto výsledky naznačují možnost jejich použití jako prakticky dokonalých antropogenních markerů odpadních vod. Na rozdíl od ostatních stopových antropogenních kontaminantů, jako jsou léčiva a produkty osobní péče, byla umělá sladidla zmiňována v environmentálních studiích teprve nedávno. Až v roce 2009 rapidně vzrostl počet odborných článků, které začaly upozorňovat na výskyt, osud a ekotoxikologický efekt AS. V odpadních vodách jsou nalézána hlavně dvě umělá sladidla (ACE a SUC), a to v mnohem vyšších koncentracích než většina produktů osobní péče. Některá AS jsou také prekurzory oxidačních produktů, které mohou vznikat v průběhu čištění odpadních nebo pitných vod ozonem [46].

Právě díky širokému využití, výjimečné stabilitě a vysoké rozpustnosti ve vodě je předpokládána stále vyšší kontaminace vod těmito sladidly [44]. Z výše popsaných vlastností lze usoudit, že koncovým recipientem acesulfamu-K a sukralosy jsou především oceány [47].

Nicméně může docházet i k velmi pomalé degradaci umělých sladidel, což z velké míry závisí na podmínkách prostředí, ve kterém se vyskytují. Například acesulfam-K a sukralosa uskladněny v provzdušňované půdě po dobu 1-3 měsíců vykazovaly známky pomalého rozkladu, z čehož plyne, že i ty nejvíce perzistentní sladidla nemusí vždy být rezistentní k mikrobiální degradaci. Mimo jiné dochází i k fotoindukovanému rozkladu, což naznačuje pravděpodobný průběh přirozeného rozpadu po delším vystavení slunečnímu záření [48].

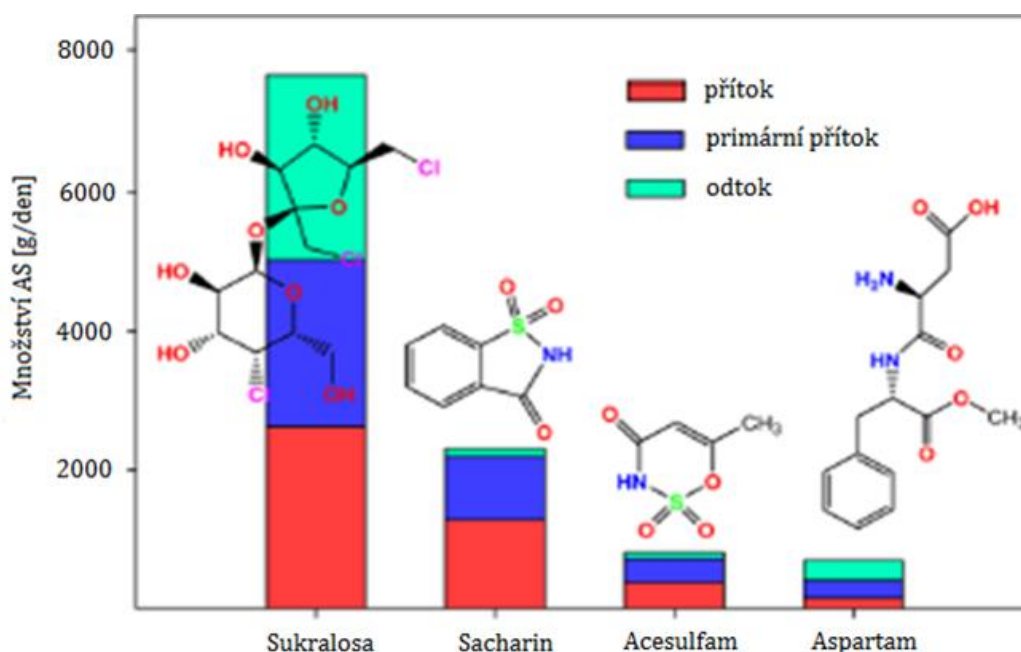
Byla studována termická dekompozice sukralosy ve vodném médiu při různém rozsahu pH (3, 7 a 11), za různých teplot (100, 140 a 180 °C), po dobu jedné hodiny. Data ukázala, že stabilita sukralosy klesá s rostoucí teplotou a pH média; při 180 °C došlo ke kompletní degradaci při všech testovaných hodnotách pH za uvolnění chloridových iontů [49].

Mnoho organochlorovaných sloučenin má tendenci k bioakumulaci v různých živočišných tkáních v průběhu jejich výskytu v ŽP. Tyto skutečnosti vyvolávají další zásadní otázku – tvorbu a hromadění potenciálně škodlivých vedlejších produktů z přirozeného rozkladu sladidel. Tato obava vyplývá z poznatků o degradaci jiných perzistentních organických polutantů, včetně polycyklických aromatických uhlovodíků, léčiv, pesticidů a produktů osobní péče, kdy mohou vznikat toxičtější degradační produkty. Pozornost věnovaná primárně zdravotním následkům je postupně přenášena na případné negativní působení v ekosystému [48; 49].

2.5. Umělá sladidla na čistírnách odpadních vod

Nejběžnější čistírny odpadních vod kombinují mechanický a biologický stupeň čištění. Organické látky jsou rozkládány pomocí biochemických procesů podmíněných činností aerobních mikroorganismů, tzv. aktivovaného kalu. Mikroorganismy umí přednostně zpracovávat přírodní látky a vzhledem k tomu, že umělá sladidla jsou synteticky připravená, je účinnost aktivovaného kalu z velké části snížena. Jeho efektivita se výrazně liší podle typu sladidla. Sloučeniny mohou být buď odbourány na CO_2 a H_2O nebo enzymatickými pochody pouze pozměněny, popř. prochází čistírnou bez výrazné změny (platí pro málo biodegradabilní látky) [50].

Na obrázku 9 je znázorněno, v jakém množství se jednotlivá umělá sladidla dostávají na ČOV a v jakém množství následně pronikají do životního prostředí.



Obrázek 9: Množství umělých sladidel na čistírně odpadních vod, upraveno dle [102]

2.5.1. Metody eliminace na čistírnách odpadních vod

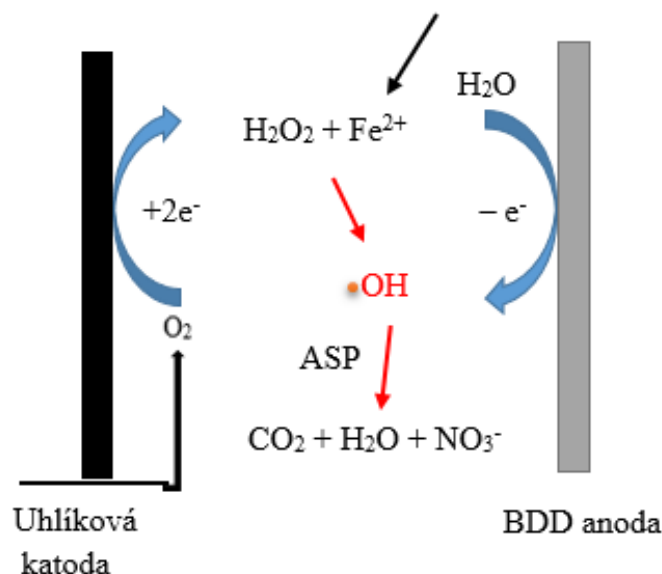
Na čistírnách odpadních vod obvykle dochází k nízkému stupni eliminace umělých sladidel, a proto se stávají jejich bodovým zdrojem. Z tohoto faktu vyplývá potřeba vyvíjet a uplatňovat účinnější metody k jejich odstraňování. Mezi běžné fyzikálně-chemické metody patří například mikrofiltrace, ultrafiltrace, reverzní osmóza, písková filtrace nebo adsorpce na aktivním uhlí. Tyto postupy jsou nicméně pro eliminaci některých organických látek nedostatečně efektivní. Mimo chemické oxidace chlorem, chloraminem nebo oxidem chloričitým lze využívat i tzv. pokročilé oxidační procesy (Advanced Oxidation Processes, AOP), které jsou předřazené biologickému stupni čištění odpadních vod, případně mohou být použity jako dočišťovací stupeň. Těchto procesů se využívá v případě, kdy znečišťující látky vykazují vysokou chemickou stabilitu nebo jsou málo biodegradabilní. Může docházet až ke kompletní

mineralizaci polutantů za vzniku CO₂, vody a anorganických sloučenin nebo alespoň k jejich transformaci za vzniku méně škodlivých produktů. Tyto technologie zahrnují fotochemické degradační procesy jako je použití UV/O₃ nebo UV/H₂O₂, dále fotokatalýzu (TiO₂/UV) a chemické oxidační procesy (O₃, O₃/H₂O₂, H₂O₂/Fe²⁺). Všechny výše zmíněné procesy generují silné oxidanty, především neselektivní hydroxylové radikály, které jsou velmi reaktivní [51].

Studie, která zkoumala eliminaci sukralosy, testovala tři fyzikálně-chemické oxidační procesy, a to UV záření, ozonizaci a použití chloru. Ukázalo se, že při dlouhodobém vystavení sukralosy UV záření nedocházelo nijak výrazně k její oxidaci a v případě použití chloru a ozonu docházelo pouze k pomalé oxidaci. Nicméně tento výsledek je velmi závislý na době, po kterou je sukralosa vystavena dávce ozonu. Po delším působení ozonu může docházet k podstatně významnější degradaci. V reálných podmínkách čistírny se ale očekává, že by degradace byla minimální, protože by přednostně docházelo k reakcím hydroxylových radikálů s jinými organickými polutanty. Tento předpoklad byl potvrzen výsledky testování reálných vzorků z čistírny odpadních vod metodou ozonizace, kdy k odstranění sukralosy docházelo pouze z 31 %. Dále byla zkoumána oxidace SUC pomocí šestimocného železa (pH = 6,5-10,1, teplota 25 °C). Výsledky prokázaly, že docházelo k účinné oxidaci, nicméně s rostoucím pH se rychlost rozkladu snižovala [4].

Další metodou, která se řadí k pokročilým oxidačním procesům, je elektrochemická oxidace, která se v posledních letech začíná více prosazovat a používat k destrukci kontaminantů. Konkrétní studie byla prováděna na acesulfamu-K. Pro lepší interpretaci výsledků byly použity tři různé druhy elektrod – Pt, PbO₂/Ti a BDD elektroda (boron-doped diamond, BDD). Závěry ukázaly, že k nejlepším výsledkům degradace docházelo na BDD elektrodě (100 % oxidace za 30 min elektrolýzy), elektroda Pb₂O vykazovala také 100% účinnost oxidace, nicméně až po 90 min elektrolýzy a platinová elektroda dosáhla účinnosti pouze 72 % za dobu 120 min elektrolýzy [52].

Další možností odstranění umělých sladidel z vodných médií je použití elektrochemických oxidačních procesů, ve kterých jsou hydroxylové radikály formovány Fentonovou reakcí. Vznik hydroxylových radikálů je patrný z obrázku 10, který zároveň znázorňuje i oxidaci aspartamu [53].



Obrázek 10: Elektrochemické pokročilé oxidační procesy – Fentonova reakce, upraveno dle [53]

2.6. Metody stanovení

Dlouho před tím, než byla umělá sladidla uznána jako environmentální polutanty, bylo vyvinuto mnoho metod jejich analýzy v potravinách, jimiž jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie, iontová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza, průtoková analýza, elektroanalýza a spektroskopie. Pro stanovení AS jako kontaminantů životního prostředí zatím neexistuje žádná národní nebo mezinárodní standardní metoda, nicméně pro jejich stanovení v akvatickém prostředí již bylo v odborné literatuře několik metod popsáno.

Většina metod pro stanovení AS ve stopovém množství v akvatických vzorcích je založena na následujících technikách – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotností spektrometrií, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a iontová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Nejčastěji se pro spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie používá elektrosprej. Tyto metody mohou být použity buď přímo, nebo častěji po zakoncentrování analytů, které se provádí extrakcí tuhou fází [46].

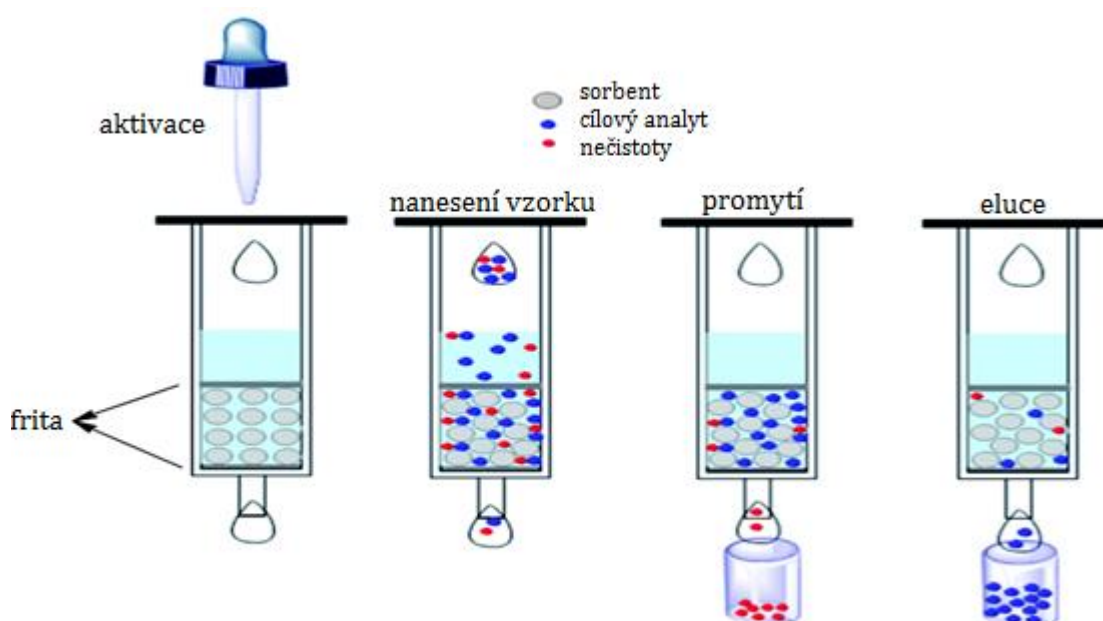
2.6.1. Extrakce tuhou fází

Chemie životního prostředí se často zabývá polutanty, které se vyskytují ve stopových až ultrastopových koncentracích. Meze detekcí současných analytických technik nejsou dostatečné pro přímé stanovení látek v matricích, proto samotná analýza vyžaduje předběžný krok – izolaci/obohacování analytů. Jednou z nejpoužívanějších metod, která umožňuje zakoncentrování analytu, je extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE) [54].

Principem této metody je zachycení sledovaných analytů na pevném sorbentu kolonky. Postup SPE je znázorněn na obrázku 11. V prvním kroku je zapotřebí kolonku kondicionovat, tzn. promýt vhodným rozpouštědlem, čímž dojde k aktivaci pevné fáze pro interakci se vzorkem. Následně je na kolonku přiváděn vzorek, z něhož jsou sorbovány sledované složky,

zpravidla spolu s interferujícími látkami. V dalším kroku se kolonka proplachuje vhodným rozpouštědlem a dochází k vymytí slaběji zadržovaných interferentů. Poté se kolonka nechá vysušit a poslední krok spočívá v eluci žádaných analytů malým množstvím rozpouštědla. Eluát je jímán a nadále zpracováván dalšími analytickými metodami [55; 56].

Nejdůležitějším krokem je správná volba podmínek separace, což vychází z výše popsáných vlastností umělých sladidel. Ty lze z hlediska chemické klasifikace dělit na peptidy, sulfonamidy a deriváty sacharidů, což jsou látky s rozdílnou polaritou. Volba extrakčních podmínek zásadně ovlivňuje výtěžnost metody. Polymer nebo silikagel (modifikovaný hydrofobními, hydrofilními, případně i iontově-výměnnými funkčními skupinami) jsou pro SPE základem separačního materiálu [9].



Obrázek 11: Extrakce tuhou fází, upraveno dle [103]

2.6.2. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

V této kapitole je popsána kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie jako samostatné metody pro analýzu polutantů životního prostředí a dále možnosti a výhody spojení těchto metod.

Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC), především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) a v poslední době též ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) a ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) patří mezi nejrozšířenější metody sloužící k analýze směsí [57].

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k dělení jednotlivých látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. V případě kapalinové chromatografie je separace založena na selektivní distribuci analytů mezi kapalnou mobilní fází a pevnou nebo kapalnou stacionární fází. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze a unášen kolonou, ve které dochází k rozdělení v závislosti na interakci analytů se stacionární a mobilní fází. Rozdělené analyty putují k detektoru, který následně indikuje jejich přítomnost. Kvalitativní charakteristikou je retenční čas dané látky (t_R), což je čas od nástřiku vzorku do eluce maxima příslušného píku. Plocha nebo výška píku jsou pak kvantitativní charakteristikou [58].

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS) patří mezi destruktivní analytické metody. Slouží k určení molekulové hmotnosti sloučenin a zároveň poskytuje informace o struktuře analyzovaných látek. Principem metody je dělení iontů na základě jejich poměru m/z .

Hmotnostní spektrometr se skládá z následujících částí:

- iontový zdroj,
- analyzátor,
- detektor,
- datový systém,
- vakuový systém [59].

První částí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, ve kterém dochází k ionizaci, tzn. k převedení molekul na ionty. V průběhu vývoje hmotnostní spektrometrie bylo objeveno velké množství ionizačních technik, přičemž některé přetrvaly, jiné byly nahrazeny a některé své uplatnění vůbec nenašly. K ionizaci plyných látek se využívají metody elektronové a chemické ionizace. V případě kapalných vzorků je nejčastěji používán elektrosprej (Electrospray Ionization, ESI), následovaný chemickou ionizací za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) a fotoionizací za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Pro pevné vzorky slouží technika MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).

Poté, co jsou molekuly převedeny na ionty, je nutné, aby došlo k separaci podle jejich poměru m/z . Rozdělení iontů je založeno na rozlišovací schopnosti analyzátorů, což odráží i různé fyzikální principy separace. Mezi základní typy hmotnostních analyzátorů patří magnetický a elektrostatický sektorový analyzátor, analyzátor doby letu, kvadrupólový analyzátor, sférická a lineární iontová past, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací, orbitrap a velmi často se využívají také různé druhy hybridních hmotnostních spektrometrů [60].

V magnetickém nebo elektrickém sektorovém analyzátoru vstupují urychlené a nabití ionty do magnetického, respektive elektrického pole a opisují kruhovou dráhu, přičemž částice s různou hmotností opisují dráhu o různém poloměru. Používají se i analyzátory s dvojí fokusací, což je sériové spojení elektrického a magnetického sektoru. Magnetický sektor zakřivuje dráhu letu iontu podle jejich momentu hybnosti, zatímco elektrický sektor zakřivuje dráhu na základě kinetické energie iontů, čímž dochází k zaostření [61].

Ve spojení s MALDI technikou je nejčastěji používán průletový analyzátor (Time of Flight, TOF). Patří mezi pulzní analyzátory – ionty jsou krátkým pulzem urychleny na vstupu do evakuované letové trubice, přičemž jim je udělena stejná kinetická energie. Nicméně ionty letí různou rychlostí, která se odvíjí na základě jejich hmotnosti, a na detektor tudíž dopadají v různém čase [62].

Dalším typem analyzátoru je kvadrupól (Quadrupole, Q), který je jednoduchý, relativně levný a vhodný pro spojení s chromatografií. Kvadrupól patří mezi laditelné filtry. Skládá se ze 4 paralelních tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu, přičemž vždy 2 protilehlé jsou vodivě spojeny. Na tyče je vloženo střídavé napětí, ke kterému je přidána stejnosměrná složka. Ionty jsou přivedeny mezi tyče a posléze začnou oscilovat. V určitý okamžik je trajektorie šroubovice stabilní jen pro vybraný iont, který prolétne analyzátozem a dopadá na detektor. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Výběr iontů je prováděn na základě velikosti amplitudy střídavého a stejnosměrného napětí [63; 64]. V hmotnostních spektrometrech může být využíváno i tandemového uspořádání kvadrupólů. Nejčastěji se využívá tzv. trojitý kvadrupólový analyzátor, ve kterém jsou za sebou řazeny 3 kvadrupóly. Prostřední z nich slouží jako kolizní cela, ve které dochází ke kolizi vybraných iontů z prvního kvadrupólu (prekurzorů) s atomy nebo molekulami kolizního plynu (nejčastěji Ar, N₂) a k následné fragmentaci. Fragmety jsou poté analyzovány pomocí třetího kvadrupólu. Tohoto analyzátoru se využívá při spojení LC/MS/MS [59].

Sférická iontová past (3D Ion Trap, 3D-IT) je tvořena třemi elektrodami – prstencovou a dvěma koncovými, na které je vloženo napětí. Past pracuje v cyklickém režimu, tzn. ionty jsou vstupním otvorem nadávkovány do pasti krátkým pulsem, dochází k jejich uchování pomocí vhodného poměru napětí vloženého na prstencovou a dvě koncové elektrody. Následuje jejich vypuzení na detektor, které je iniciováno postupnou změnou napětí. Velkou výhodou sférické iontové pasti je možnost tandemové a vícestupňové hmotnostní spektrometrie, kdy v prvním kroku je v pasti izolován zvolený prekurzor, který je pak fragmentován kolizemi s atomy helia, jež jsou v pasti přítomny, a následně produkty fragmentace jsou poté skenovány. Případně může být izolován prekurzor následující generace a proces lze opakovat.

Lineární iontová past (Linear Ion Trap, LIT) je v podstatě kvadrupól, na jehož konci jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem, a tudíž je schopná uchovávat ionty. Na rozdíl od 3D iontové pasti se vyznačuje vyšší účinností napouštění a záchytu iontů (až 90 %), z čehož plyne lepší výsledný signál, a dále větším vnitřním objemem, což znamená vyšší kapacitu a tudíž lepší odolnost vůči vzniku prostorového náboje [64; 65].

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR) patří mezi nejdražší a zároveň neúčinnější analyzátoři v hmotnostní spektrometrii. Základními prvky analyzátoři jsou:

- magnet schopný produkovat stabilní a konstantní magnetické pole vysoké intenzity,
- cela umístěná ve střední části magnetu,
- systém zajišťující extrémně vysoké vakuum,
- datový systém, který je schopný uchovat velké množství signálů.

Cela má 2 elektrody přijímače a 2 elektrody vysílače a ionty v ní působením magnetického pole vykonávají cyklotronový pohyb. Pomocí vysílače se vkládá radiofrekvenční vlnění. Pokud má stejnou frekvenci jako je frekvence rotace iontu, začne daný iont opisovat kružnici o větším poloměru, čímž se přiblíží k deskám přijímače, ve kterých indukuje střídavý proud, ten je poté zaznamenán a Fourierovou transformací přeložen do domény m/z [61; 66].

Orbitrap je nejnovější typ vysokorozlišovacího hmotnostního analyzátoři a vzhledem k tomu, že nepotřebuje magnetické pole jako FT-ICR, je i výrazně levnější, ovšem jeho rozlišovací schopnost je nižší. Skládá se z vnější a středové elektrody vřetenovitého tvaru, na kterou je vkládáno napětí. Ionty injektované mezi elektrody jsou zachyceny, oscilují kolem vnitřní elektrody a indukují proud, přičemž se měří jeho závislost na čase, která je poté přeměněna Fourierovou transformací na signál [67; 68].

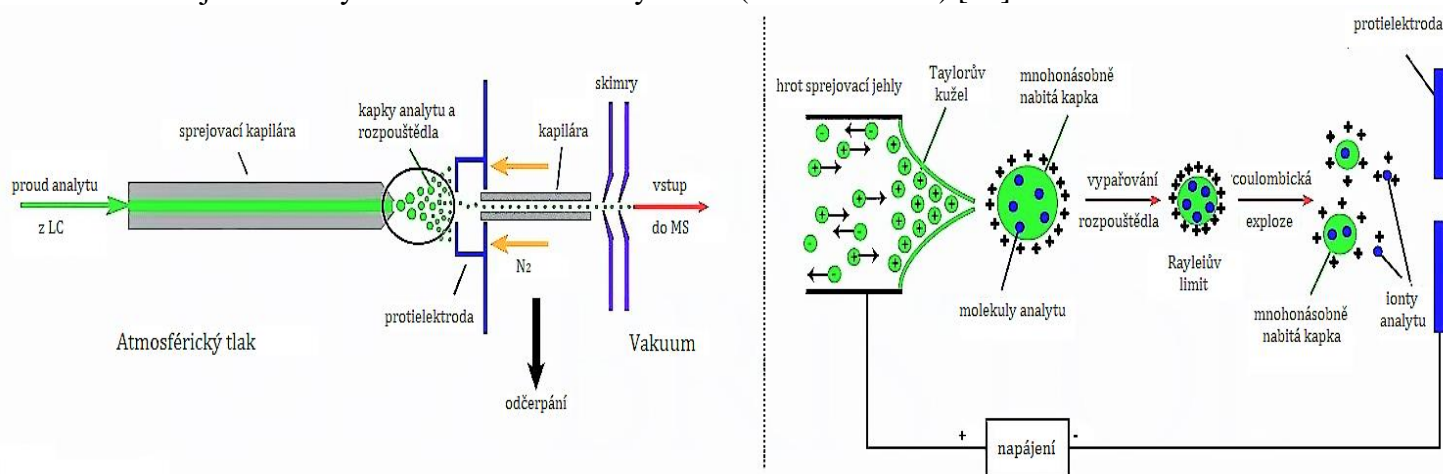
Ionty, které prošly analyzátoři, dopadají na detektor a generují elektrický proud, který je transformován na signál. Nejčastěji bývá používán elektronový násobič, který funguje na principu násobení elektronů dopadajících na sérii dynod nebo nověji na kontinuální dynodu [60].

LC/MS

Hlavní výhodou spojení hmotnostní spektrometrie s chromatografií je získání kvalitní separace analytů a zároveň jejich lepší detekce. Dnes je toto spojení běžně a hojně využíváno pro detekci polutantů životního prostředí.

V počátcích rozvoje této metody bylo třeba vyřešit dva hlavní problémy. Prvním problémem bylo pracovní prostředí obou technik. Separační techniky pracují za normálního tlaku, zatímco hmotnostní spektrometr vyžaduje poměrně kvalitní vakuum, protože během transportu iontů hmotnostním spektrometrem nesmí docházet ke srážkám iontů s jinými molekulami. Bylo nutné vymyslet, jakým způsobem propojit výstup z kolony s iontovým zdrojem MS. Druhým problémem v této oblasti bylo množství kapalně mobilní fáze vystupující z chromatografu. Jednodušší řešení bylo propojit plynovou chromatografií, a to z důvodu používání kapilárních kolon, které se vyznačují malým průtokem, a proto může být konec kolony přímo zaveden do iontového zdroje. Technicky náročnější bylo propojení kapalinové chromatografie – kolonou protéká velké množství mobilní fáze, která není kompatibilní s hmotnostním spektrometrem [58; 69].

Průlom nastal s objevením elektrospreje – sprejovací techniky, která pracuje za atmosférického tlaku a patří mezi měkké ionizační techniky, tudíž k fragmentaci dochází pouze v minimálním rozsahu. Dochází k převodu iontů z kapalně fáze do plynné a vznikají kvazimolekulární ionty $[M+H]^+$, popřípadě mohou vznikat i adukty s Na^+ a K^+ . Při detekci negativních iontů jsou nejčastěji sledovány kvazimolekulární ionty typu $[M-1]^-$. Elektrosprej se používá především pro látky mírně až vysoce polární. Mechanismus elektrospreje spočívá v přivedení analytu do iontového zdroje kovovou kapilárou. Mezi kovovou kapilárou a protielektrodou (vstup do hmotnostního spektrometru) je vkládáno vysoké napětí v řádech kV (obvykle 3–4 kV). Na hrotu kapiláry dochází působením elektrostatického pole k tvorbě nabitých kapiček aerosolu, která je podporována působením zmlžovacího plynu. Vzniklé kapičky se setkávají se zahřátým sušícím plynem, což vyvolá vypařování rozpouštědla. Tím se zvětšuje hustota povrchového náboje, a když elektrostatické odpuzování souhlasně nabitých iontů u povrchu kapiček překoná síly soudržné (povrchové napětí), dochází ke Coulombické explozi a vzniku několika dalších menších kapiček. Tyto exploze probíhají opakovaně až do uvolnění kvazimolekulárních iontů, které jsou vedeny k hmotnostnímu analyzátoru (viz obrázek 12) [59].



Obrázek 12: Mechanismus elektrospreje, upraveno dle [105]

Jako analyzátoři v LC/MS jsou nejčastěji využívány kvadrupól (případně trojitý kvadrupól), sférická i lineární iontová past a z hybridních systému nejčastěji kvadrupól ve spojení s analyzátořem doby letu [66].

2.6.3. Optimalizace metody

Prvním krokem k úspěšné optimalizaci metody je zvolit vhodný sorbent SPE kolonky, na kterém bude probíhat zakoncentrování sledovaných analytů. Aby došlo k co nejlepšímu zakoncentrování, musí být vhodně zvolené rozpouštědlo pro kondicionaci. Velkou roli při zachytu analytů hraje též objem nanášeného vzorku (nesmí dojít k přetížení kolonky) a rozpouštědlo, kterým je kolonka promyta po nanesení vzorku. Po určité době sušení dochází k eluci, což je krok, během kterého musí opět být pečlivě zváženo, jaké rozpouštědlo bude nejvhodnější použít.

Pro optimalizaci metody byly hodnoceny různé druhy sorbentů; s polymerní reverzní fází (Oasis HLB, Env+, Plexa a Strata X) nebo slabě (Oasis VAX) či silně (Oasis SAX a Plexa PAX) aniontově výměnné sorbenty. Nejčastěji používanými rozpouštědly pro kondicionaci jsou methanol a voda. Nanášený objem vzorku se liší s každou metodou, přičemž obvykle je nanášeno 50 nebo 100 ml. Následně je kolonka promyta vodou a vysušena. K eluci sladidel je používán methanol. Eluát je odpařen pod dusíkem, odparek rozpuštěn ve vhodně zvolené směsi a posledním krokem je samotná analýza. Z výše popsaných údajů vyplývá složitost optimalizace metody. Výtěžnost kolonky je dána i pH vody, která slouží ke kondicionaci a k promytí. Může být použita voda s neutrálním pH nebo okyselená. Nanášený vzorek by poté měl být upraven na stejné pH jako použitá voda. K rozpuštění odparku lze využít různé postupy. Jednou z možností je rozpustit odparek v čistém methanolu, dalším způsobem je rozpuštění ve směsi methanolu a vody ve vhodně zvoleném poměru, v neposlední řadě byla použita i směs, která odpovídala složení mobilní fáze pro danou analýzu [45; 70; 71].

Pro představu je uveden příklad použité metody pro SPE:

Všechny výše uvedené kolonky byly kondicionovány 5 ml methanolu a 5 ml Milli-Q vody okyselené na pH 2. Následně byl nanesen vzorek (pH 2) o objemu 50 ml s koncentrací sladidel 5 µg/l. Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 10 ml Milli-Q vody (pH 2) a po třicetiminutovém vysušení byl analyt eluován 2 ml methanolu, eluát odpařen a odparek rozpuštěn v methanolu. Přijatelnou výtěžnost (> 60 %) dosahovaly sorbenty s reverzní fází, tzn. Oasis HLB, Env + a Strata X. Výjimkou byl sorbent Plexa, který pro ACE a CYC vykazoval velmi nízkou účinnost (pod 10 %). V případě iontově výměnných sorbentů byla výtěžnost kolonek nízká jen pro některá sladidla (např. výtěžnost sorbentu Oasis WAX a Plexa PAX byla nízká pro ASP, Oasis MAX pro ACE). V dalším kroku byl sledován vliv objemu vzorku na výtěžnost. Na kolonky bylo nanášeno 50, 100, 200 a 500 ml vzorku (Milli-Q voda s koncentrací 1 µg/l každého sladidla). U ASP, SAC a SUC nebyl pozorován vliv použitého objemu na výtěžnost, ale u CYC a ACE docházelo u každého použitého sorbentu s rostoucím objemem vzorku ke klesající výtěžnosti. Z těchto výsledků lze vyvodit, že nejvhodnější objem použitého vzorku je 50 ml. Z celkového hodnocení všech sledovaných parametrů byla vybrána Oasis HLB jako nejvhodnější kolonka pro předúpravu vzorku [70].

Vhodnost kolonky Oasis HLB (hydrofilně-lipofilní poly(*N*-vinylpyrrolidon-divinylbenzen) kopolymer) byla potvrzena i v jiné studii, ve které byly hodnoceny následující separační materiály – Chromabond C18ec, Bakerbond SPE Octadecyl, Bakerbond SPE Phenyl, LiChrolut RP-18, Supelclean LC-18, Discovery DSC-18, Zorbax C18, Strata X-RP, Oasis HLB a Bakerbond SPE SDB-1. Výtěžnost na kolonce Oasis HLB byla v případě acesulfamu-K 92 %, aspartamu 99 %, cyklamátu 83 %, sacharinu 97 % a sukralosy 100 %. Analyzovaný vzorek vody byl upraven na pH 4,5, nastavená průtoková rychlost byla 0,5-1 ml/min a stejně jako v předchozím případě byl pro eluci použit methanol [71].

Míra výtěžnosti se odvíjí i od měrného povrchu separačního materiálu, např. měrný povrch 60 m²/g kolonky Oasis HLB není pro acesulfam-K a cyklamát příliš vhodný (vhodnější je měrný povrch 300 m²/g). Další vliv na výtěžnost má způsob skladování vzorku. Bylo dokázáno, že obsah sacharinu a cyklamátu ve vzorcích skladovaných v lednici v porovnání se zmraženými

vzorky klesá, což může být pravděpodobně způsobeno biotransformací. Z tohoto důvodu není dlouhodobé skladování vzorků vhodné, případně lze oxidaci analytů zabránit dávkováním azidu sodného nebo kyseliny askorbové při odběru [9].

Pro následnou analýzu byly popsány především následující dvě metody – kapalinová chromatografie obrácených fází (RPLC) a chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), přičemž z dostupných údajů vyplývá, že vhodnější metodou pro stanovení umělých sladidel ve vodách je RPLC, proto je nadále pojednáváno o této metodě.

Pro nalezení nejvhodnější metody LC je třeba optimalizovat celou řadu parametrů od vhodné zvolené kolony, přes složky mobilní fáze a gradientu, teploty kolony, průtokové rychlosti mobilní fáze nebo dávkovaného objemu.

Pro představu je uveden příklad analýzy na kapalinovém chromatografu:

Separace probíhala na koloně Luna C18, 100 mm x 2,0 mm. Teplota kolony byla 40 °C, průtoková rychlost mobilní fáze 0,2 ml/min a dávkovaný objem vzorku 10 µl. Jako mobilní fáze byla zvolena voda (složka A) a methanol (složka B), obě složky obsahovaly 5 mM octan amonný. Gradient pro separaci byl zvolen následovně:

- 0 min (5 % B),
- 10 min (50 % B),
- 12 min (50 % B),
- 12,6 min (5 % B),
- 22 min (5 % B).

Jako detektor k této metodě byl použit hmotnostní spektrometr [70]. Pokud má být stanoven co největší rozsah analytů během jedné analýzy hmotnostní spektrometrií, je zapotřebí, aby analýza proběhla v negativním ionizačním módu, protože v pozitivním módu lze stanovit pouze aspartam, sacharin a sukralosu [9].

Vhodně zvolená metoda analýzy umělých sladidel umožňuje získat koncentrace, které napoví, v jakém množství se AS vyskytují v životním prostředí. Na základě těchto výsledků se pomocí ekotoxikologických testů dá předpokládat vliv AS na ekosystém.

2.7. Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je věda, která se zabývá vztahem mezi toxickými látkami a živými organismy. Pojem ekotoxikologie zavedl francouzský vědec René Truhaut v roce 1969. Základy této vědy jsou položeny na poznatcích z ekologie a toxikologie, ale ke správnému vyhodnocení těchto poznatků je třeba využívat výsledky z celé řady oborů, jako jsou například chemie, fyzika, geologie, hydrochemie, v neposlední řadě klimatologie nebo lékařství. Dělí se na několik oblastí podle chemické podstaty toxikantu, způsobu jeho vniknutí do prostředí, charakteru systému, do kterého vniká, a dalších specifických hledisek. Vzhledem k široce se rozvíjejícímu chemickému průmyslu dochází k uvolňování a vnikání látek do prostředí, kde působí určitým způsobem vlastním každé látce. V dřívějších dobách byla řešena především toxikologie, tzn. působení látek na člověka, ale s pokročilejší dobou mají výstupy tohoto oboru zásadní význam pro řešení problematiky ochrany životního prostředí.

Z hlediska oblasti řešení problémů se dá rozdělit na prospektivní a retrospektivní. Prospektivní ekotoxikologie se zabývá prevencí znečištění prostředí, což zahrnuje testování nových chemických látek a zhodnocení z ekotoxikologického hlediska. Rizika nových chemických látek lze predikovat na základě výsledků laboratorních testů. Retrospektivní ekotoxikologie řeší dopady užívání „starých“ chemických látek, hodnotí staré ekologické zátěže a sleduje příznaky negativního působení na organismy pomocí terénních studií a dlouhodobého monitoringu prostředí [72].

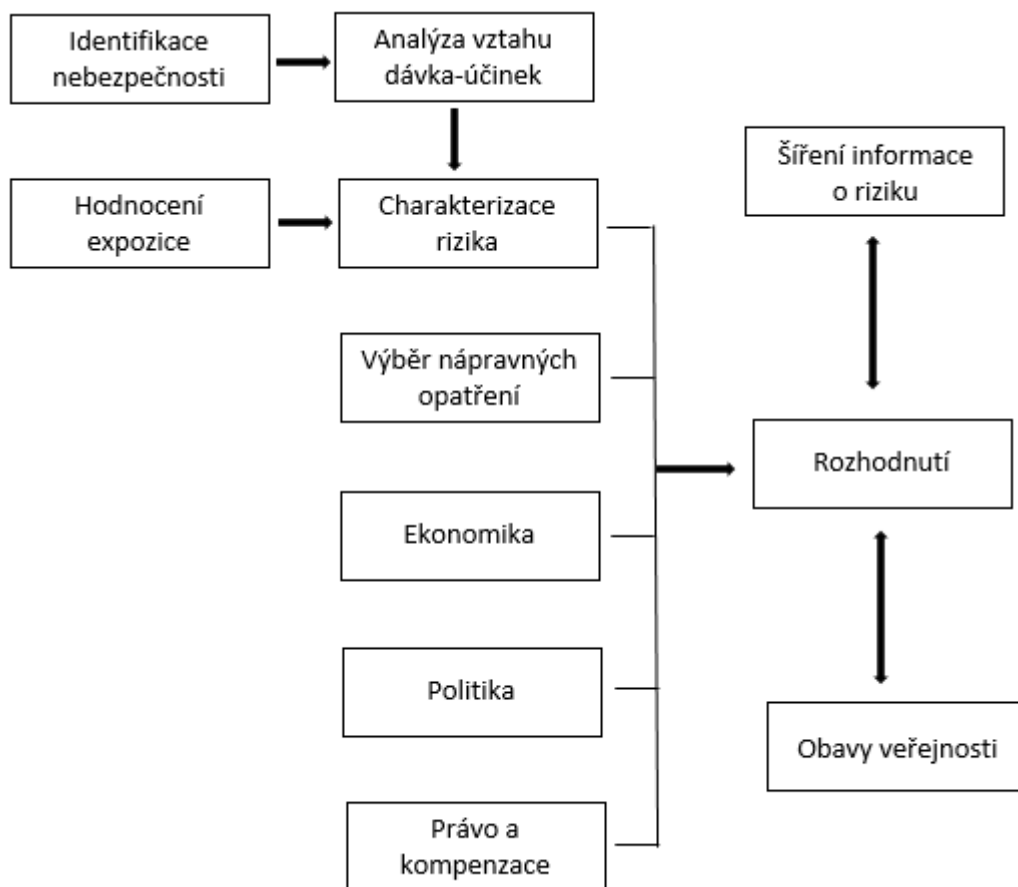
2.7.1. Hodnocení environmentálních rizik

Se zvyšující se výrobou a užíváním chemických látek souměrně roste jejich koncentrace v životním prostředí. Způsob, jakým se do něj mohou dostávat, závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech látky i prostředí, způsobu použití, výroby a nakládání. Do životního prostředí mohou pronikat i jako vedlejší produkty lidské činnosti, což je případ umělých sladidel [73].

Hodnocení rizika je postup založený na shrnutí všech dostupných údajů, na základě nichž se určí druh a stupeň nebezpečnosti představované určitou látkou. Sestává ze čtyř základních kroků:

- určení nebezpečnosti
- analýza vztahu dávka – odpověď
- hodnocení expozice
- charakterizace rizika [74]

Schéma tohoto procesu je uvedeno na následujícím obrázku 13:

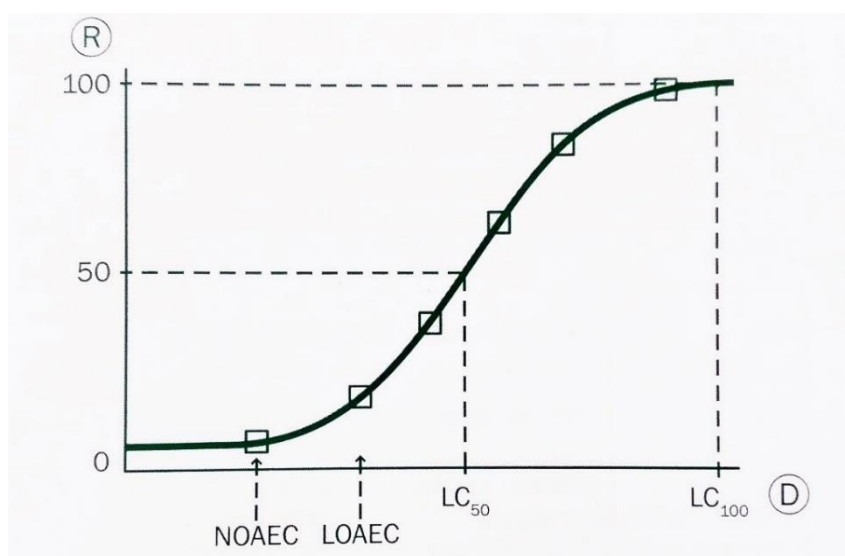


Obrázek 13: Hodnocení rizik, upraveno dle [74]

2.7.1. Vztah mezi organismem a toxickou látkou

Látky, které přichází do styku s organismem, ho mohou ovlivnit pozitivně, ale i negativně, což záleží především na charakteru i koncentraci dané látky a době expozice. Po proniknutí látky do organismu dochází ke vzájemnému působení, tj. organismus je ovlivňován látkou, která naopak více či méně podléhá metabolickým pochodům organismu. Může docházet k biotransformaci a následnému vylučování obvykle méně toxických produktů [73].

Odpověď organismů v závislosti na dávce toxikantu hodnotí ekotoxikologické testy. Křivky popisující tuto závislost se nazývají křivky dávka-odpověď (D-R křivky, Dose-Response Curve), viz obrázek 14. Z výsledků testů lze na základě sledovaných endpointů vypočítat ekotoxikologické hodnoty, které charakterizují nebezpečnost látky [72].



Obrázek 14: Křivka dávka-odpověď [72]

Parametry, které jsou odvozené z křivky dávka-odpověď:

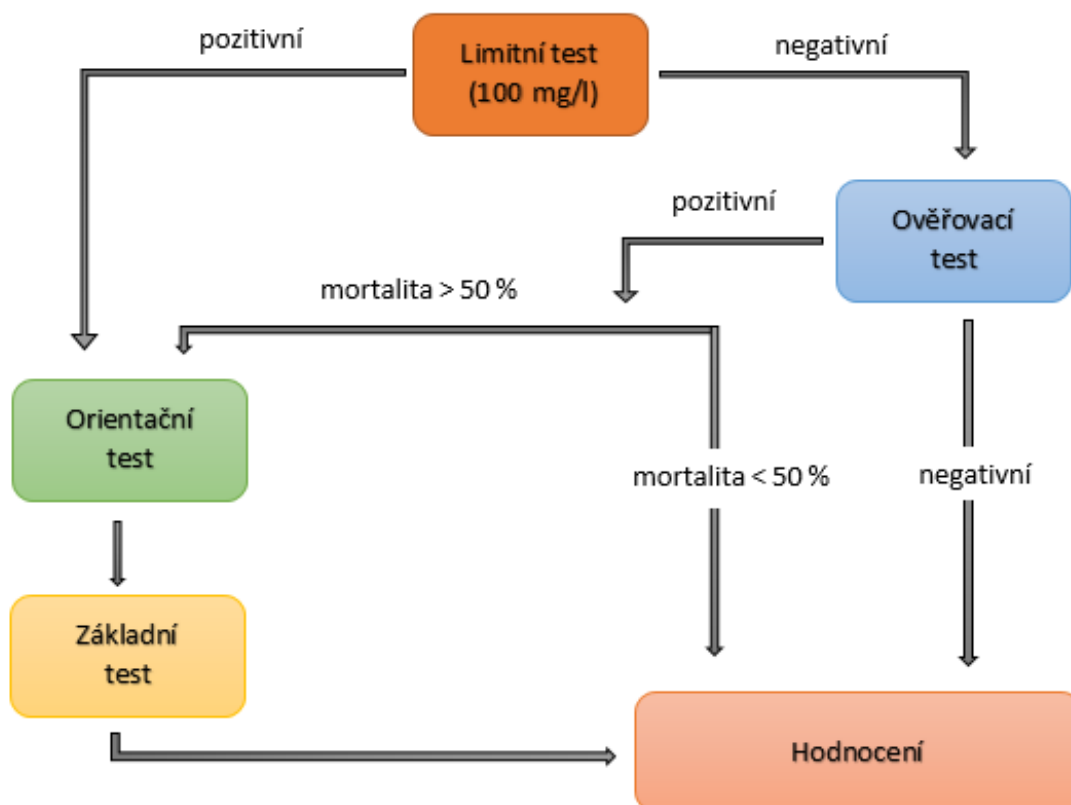
- NOAEC (No Observed Adverse Effect Concentration)
 - nejvyšší koncentrace, při které nebyl pozorován škodlivý účinek
- LOAEC (Lowest Observed Adverse Effect Concentration)
 - nejnižší koncentrace, při které byl pozorován škodlivý účinek
- LC_x (letální koncentrace pro x % jedinců)
 - koncentrace, při které uhynie x % testovaných jedinců
- LD_x (letální dávka pro x % jedinců)
 - dávka, při které uhynie x % testovaných jedinců
- EC_x (efektivní koncentrace pro x-procentní účinek)
 - koncentrace, při které se projeví x-procentní účinek v porovnání s kontrolou
- ED_x (efektivní dávka pro x-procentní účinek)
 - dávka, při které se projeví x-procentní účinek v porovnání s kontrolou [72]

2.7.2. Ekotoxikologické biotesty

Vliv škodlivých látek nebo jejich směsí na životní prostředí je hodnocen pomocí ekotoxikologických testů, které slouží k odhadu nebo k určení environmentálních dopadů testované látky. Provádějí se za přesně definovaných podmínek a jejich cílem je určit, zda koncentrace zkoumané látky bude nežádoucím způsobem ovlivňovat biologické funkce ekosystému. Nejčastěji bývají děleny následujícím způsobem:

- podle doby expozice
 - krátkodobá expozice posuzována pomocí testů akutní toxicity
 - dlouhodobá expozice hodnocena pomocí testů chronické toxicity
 - přechodnou kategorií jsou testy subchronické toxicity [73; 75; 76]
- podle uspořádání testu
 - 1. generace – klasické, konvenční biotesty
 - 2. generace – alternativní biotesty
 - 3. generace – testy využívající biosenzory, biosondy a biomarkery [77]
- podle úrovně provedení
 - na úrovni buněk a tkání – používány pro teoretické objasnění účinků toxických látek na organismy
 - na úrovni jedinců – nejrozšířenější, protože mají lepší vypovídající hodnotu
 - na úrovni společenstev – toxický účinek se sleduje v přírodě nebo na modelu, který je přírodě blízký, nevýhodou je reprodukovatelnost výsledků, protože toxický účinek se nemusí vždy projevit stejně [76; 78]
- další
 - testovaná matrice (voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka)
 - trofická úroveň testovacích organismů (producenti, konzumenti, destruenti)
 - typ testované látky (čistá chemická látka, směs látek, přírodní vzorky) [76; 78]

Schéma postupu při testech toxicity je uveden na následujícím obrázku 15:



Obrázek 15: Průběh ekotoxikologického testování, upraveno dle [96]

2.8. Vliv umělých sladidel na organismy akvatického prostředí

Všechny potravinové přídatné látky včetně AS musí být velmi důkladně testovány s ohledem na jejich případný nepříznivý účinek pro lidský organismus. I přesto, že vědci již začali studovat osud a množství AS v životním prostředí, jejich ekotoxikologické vlastnosti nejsou dostatečně prozkoumané a vzhledem k vysoké perzistenci některých z nich by jim měla být věnována pozornost v mnohem větším měřítku než doposud.

I když se předpokládá, že umělá sladidla zatím nepředstavují pro vodní organismy zvýšené riziko akutní toxicity, je třeba provádět další testy a studie, které se budou zaměřovat také na toxicitu chronickou. V této oblasti je nutné zkoumat nejen jednotlivá sladidla, ale také jejich směsi. Nemohou být vyloučeny ani toxické účinky směsí umělých sladidel s jinými látkami, např. s léčivými, o kterých je rovněž známo, že nejsou na ČOV odstraňovány se 100% účinností. V neposlední řadě je důležitým prvkem správná volba endpointů. Po vstupu umělých sladidel do životního prostředí dochází více či méně k jejich transformaci nebo biodegradaci. Tyto procesy mohou být doprovázeny formací jiných toxických látek. Takovým případem je transformace sukralosy – v přítomnosti glycerolu může docházet ke vzniku toxického chloropropanolu [4].

Prvním umělým sladidlem detekovaným v životním prostředí byla sukralosa, a proto je nejvíce studií zaměřeno právě na ni. Příklady těchto studií jsou uvedeny níže.

Semichronická toxicita sukralosy na akvatické rostlině Lemna gibba

Jednou z prvních studií bylo pozorování růstu rostliny *L. gibba*, která byla nejprve ponechána v živném médiu s obsahem a bez obsahu sacharosy, ve kterém probíhala aklimatizace po dobu jednoho týdne. Po uplynutí této doby byly dvě rostlinky okřehku se 4 stélkami přeneseny do testovaného média obsahující různé koncentrace sukralosy. Testovaná média byla udržována při teplotě 25 °C a osvětlení 6 800 Lux. Test probíhal po dobu sedmi dnů a na jeho konci nebyl pozorován žádný nepříznivý účinek v koncentraci do 1 000 mg/l [44; 79].

Chronická toxicita sukralosy na testovacím organismu Daphnia magna

Testování bylo prováděno podle metodiky OECD 202/211. Na základě předběžných testů byla zvolena následující koncentrační řada: 0; 180; 320; 560; 1 000 a 1 800 mg/l sukralosy ve vodném médiu. Pro kontrolu a každou koncentraci bylo provedeno 10 opakování. Testovací komora obsahovala 50 ml testovacího roztoku a jeden testovací organismus *D. magna*. Celý test trval 21 dní při fotoperiodě světlo/tma (16/8 hod). Každé pondělí, středu a pátek byly připravovány nové roztoky, do kterých byly pozorované organismy přenášeny, zároveň byla vyhodnocena a zaznamenána úmrtnost a imobilizace organismů. Pět dní před ukončením testu byl vyhodnocen počet potomků. Během průběhu testu nebylo pozorováno žádné úmrtí v kontrole ani v testovaných koncentracích. V kontrolních vzorcích byl průměrný počet neonatů 161, v testovaných vzorcích byl počet nižší, ale nijak významně (151-159 neonatů). Na závěr byly stanoveny hodnoty NOEC a LOEC na 1 800 mg/l, respektive > 1 800 mg/l [80].

Testování bioakumulace sukralosy v akvatických organismech

Vzhledem k poměrně vysokým koncentracím sukralosy v povrchových vodách byla provedena studie, která se zabývala schopností sukralosy bioakumulovat se v organismech akvatického prostředí. Byla vybrána baterie testů, která zahrnovala organismy různé trofické úrovně. Jednalo se o sladkovodní řasu *Pseudokirchneriella subcapitata*, perloočku *D. magna* a ryбку *Danio rerio*. Pro testování byly zvoleny dvě koncentrace, a to 10 mg/l a 100 mg/l, přičemž pro každou koncentraci byla nasazena dvě opakování. Míra bioakumulace se zjišťovala na základě porovnání s kontrolní skupinou.

Test s řasami byl proveden při teplotě 23 ± 2 °C, za stálého osvětlení a dobou expozice 48 hodin. Pro hodnocení bioakumulace bylo z každého vzorku odebráno 100 ml média, které bylo od buněk řas odděleno filtrací přes skleněná vlákna za pomoci vakua. Následně byly řasy opláchnuty malým množstvím destilované vody, umístěny na filtrační papír a uchovány při teplotě -20 °C do provedení analýzy. Po provedení analýzy byla hodnota biokoncentračního faktoru (BCF) stanovena na 0,10 pro nižší koncentraci a 0,13 pro vyšší koncentraci.

Dále byl zjišťován BCF pro dafnie, přičemž k testování byly použity dafnie staré 7 dní. Test probíhal při teplotě 23 °C a fotoperiodě světlo/tma (16/8 hod). Do každé testovací nádoby bylo přeneseno 650 dafnií, které během testu nebyly krmeny. Jednalo se o statický test, při kterém byly perloočky vystaveny expozici sukralosy po dobu 48 hodin. Z analýzy bioakumulace byl stanoven BCF pro koncentrace 10 mg/l, respektive 100 mg/l na hodnotu 2,2, respektive 1,6.

Poslední skupinou testovacích organismů v této studii byly malé rybky *D. rerio*. Pro účely testu byly zvoleny jedinci přibližně ve věku 10 měsíců. Byl proveden semistatický test, při kterém byly testovací organismy nejdříve vystaveny zvoleným koncentracím sukralosy po dobu 48 hodin a následně dalších 48 hodin byly nádoby proplachovány čistou vodou. V průběhu testu byla udržována teplota na 25 °C při fotoperiodě světlo/tma (16/8 hod). Při hodnocení bioakumulace bylo zjištěno, že prvních 24 hodin docházelo k významné akumulaci, nicméně po 48 hodinách expozice byl stav již ustálený. BCF byl pro obě koncentrace nižší než 1. Při hodnocení výsledků druhé části testu bylo zjištěno, že došlo k rapidnímu poklesu obsahu sukralosy v organismech.

Tato studie ukázala, že vzhledem k nízkým hodnotám BCF sukralosa nevykazuje bioakumulativní charakter pro vodní organismy. Hodnota BCF, která charakterizuje perzistentní, bioakumulativní a toxickou látku, je $\geq 2\ 000$, což nebylo překročeno ani v jednom případě testování [81].

Biochemická odpověď koryšů na expozici sukralosou

Z výše uvedeného přehledu dostupných studií vycházejících ze standardizovaných testů prozatím vyplývá, že sukralosa pravděpodobně nepředstavuje zvýšené riziko pro životní prostředí. Avšak studie, která se zabývala dalšími endpointy jako jsou fyziologické změny a změny v chování u zástupce koryšů *D. magna* v přítomnosti sukralosy naznačuje, že změny v chování mohou souviset s alterací hladin acetylcholinesterázy (AChE). Acetylcholinesteráza je enzym, který způsobuje degradaci neurotransmiteru acetylcholinu. V případě inhibice tohoto enzymu dochází ke kumulaci acetylcholinu, což má za následek ovlivnění nervové soustavy. (Pozn. Pokud je zkoumána neurotoxicita dané látky, inhibice AChE je nejčastější indikátor neurologického efektu). Ve druhém případě může docházet k aktivaci AChE, což má za následek zvýšený výskyt reaktivních forem kyslíku a dusíku, který vede ke vzniku oxidačního stresu. K samotnému testu byli použiti neonati (< 24 dnů) dafnií, kteří byli po dobu tří dnů umístěni v živném médiu podle metodiky OECD 211. Po uplynutí této doby byli přemístěni v počtu 30 jedinců do kádinek, které obsahovaly 100 ml média s obsahem sukralosy o následujících koncentracích: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 500; 1 000 a 5 000 $\mu\text{g/l}$. Pro každou koncentraci byl nasazen duplikát a kontrola a celkově byl test opakován 4x. Po 24 hodinách byly organismy přeneseny do vialek a uchovány při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do doby, než proběhla biochemická analýza. Výsledkem bylo zjištění, že během expozice sukralosy došlo k aktivaci AChE v porovnání s kontrolní skupinou. U lidí je prokázána souvislost mezi aktivací AChE a vznikem oxidačního stresu, a z tohoto důvodu se předpokládá, že tento mechanismus je zodpovědný i za změny chování koryše *D. magna* [44; 82].

Ekotoxikologické testování acesulfamu, cyklamátu a sacharinu

Studií, které by se zabývaly testováním ACE, CYC a SAC, je velmi málo. Vzhledem k vysoké perzistenci (ACE) nebo vysokému stupni rozkladu a vzniku degradačních produktů (SAC a CYC) je potřeba se touto problematikou nadále zabývat. O to se pokusila studie, která testovala ekotoxicitu umělých sladidel prostřednictvím respirační rychlosti aktivovaném kalu, inhibice reprodukce řas *Scenedesmus vacuolatus*, inhibice růstu rostliny *L. minor* a testu akutní imobilizace koryše *D. magna*.

Test toxicity vůči aktivovanému kalu byl proveden podle metodiky OECD 209. Tato metoda je založena na snížení respirační rychlosti organismů aktivovaného kalu, která se projeví po negativním působení testované látky. Do aktivovaného čistírenského kalu se přivádělo syntetické krmivo, obsahující všechny potřebné živiny společně s testovanou nebo referenční látkou a směs byla 30 minut provzdušňována. Následně byla převedena do Karlsruhe lahvi a pomocí kyslíkové elektrody byl zaznamenáván obsah kyslíku po dobu deseti minut.

Test na řasách se prováděl s autosporami, což jsou mladé buňky řas na začátku růstového cyklu. Řasy byly vystaveny testované látce po dobu jednoho růstového cyklu (24 h). Sledovaným endpointem byla inhibice reprodukce řas měřená jako inhibice růstu populace.

Akutní imobilizace korýše *D. magna* byla hodnocena použitím komerčně dostupného alternativního testu Daphnotoxkit. Test byl proveden s neonaty starými méně než 24 hodin při teplotě 20 °C a za tmy. Do média s testovanou látkou bylo umístěno 5 jedinců, u kterých se po 24 a 48 hodinách sledovala imobilizace, případně úmrtnost. Všechny látky byly testovány ve třech nezávislých experimentech v pěti opakování. V prvním testu byl hledán vhodný rozsah koncentrací (5 různých koncentrací, 5 opakování). Ve dvou dalších byla ověřena zvolená koncentrace (1 000 mg/l) opět v pěti opakováních.

Další ekotoxikologické posouzení umělých sladidel se provádělo na rostlině *L. minor*. Zásobní kultury byly pěstovány v otevřených Erlenmayerových baňkách ve Steinbergově médiu při teplotě 24 ± 2 °C a osvětlení 6 000 Lux. Pro test na rostlině *L. minor* byly použity rostliny s 2-3 stélkami vystavené testované látce po dobu 7 dní. Po týdnu byla zjišťována inhibice růstu oproti kontrole. Všechna umělá sladidla byla testována ve třech opakováních.

Výsledky všech testů ukázaly, že u sledovaných sladidel nebyl pozorován nepříznivý účinek v koncentracích až do 1 000 mg/l, tato hodnota koncentrace byla vypočtena jako NOEC. Tyto závěry naznačují nízké potenciální nebezpečí akutní toxicity testovaných umělých sladidel pro vodní organismy. Objevují se názory, že přítomnost AS na čistírnách odpadních vod by mohla ovlivnit účinnost biologického stupně čištění z důvodu inhibice aktivovaného kalu. Nicméně výše zmíněná studie poukazuje na to, že až do koncentrace 1 000 mg/l nedošlo k žádné inhibici aktivovaného kalu, a proto se zhoršená účinnost neočekává [42].

Dalším důležitým krokem v oblasti objektivního posouzení dopadu sladidel na akvatický ekosystém je charakterizace a identifikace transformačních produktů. Neméně důležitou částí v celkovém posouzení je i vhodná volba cílových organismů a zohlednění ekotoxikologického dopadu směsí, a to nejen umělých sladidel, ale i jejich směsí s dalšími tzv. pseudorezistentními polutanty, například s léčivými. Přestože ze současně dostupné literatury vyplývá, že AS v této chvíli nepředstavují závažný problém pro životní prostředí, je nutné zamyslet se nad současnými ekotoxikologickými metodami a jejich vhodností pro testování umělých sladidel [42].

2.9. Ekotoxikologické testy na vodních organismech

Akvatické prostředí představuje konečný cíl pro většinu antropogenních znečišťujících látek uvolňovaných z průmyslu, dopravy, zemědělství, urbanizace a každodenního života lidské populace. Na druhou stranu, voda je nezbytným zdrojem k uspokojení lidské potřeby. Zachování funkce ekosystému je proto založeno na důkladné analýze rizik spojených s přítomností škodlivých látek ve vodním prostředí [83].

Využití vodních organismů k testování ekotoxikologických účinků látek patří mezi nejrozšířenější metodiky. Princip těchto testů je podobný. Nejprve je připravena koncentrační řada toxikantu a touto řadou jsou naplněny testovací nádoby. Do každé testované koncentrace se umístí určitý počet organismů a po předepsané době se sleduje jejich odpověď na expozici ve srovnání s organismy kontrolní skupiny. Akvatické testy se používají pro hodnocení chemických látek a přípravků, odpadních vod i přírodních toxinů. Nejběžnějšími metodikami jsou testy na rybách, korýších, vodních rostlinách, řasách a bakteriích.

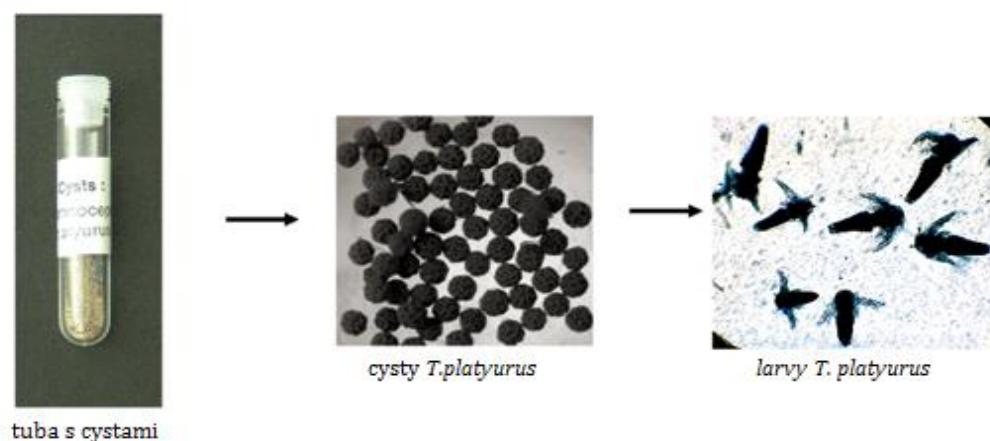
Další možností jsou tzv. alternativní biotesty, jejichž předností je miniaturizace a využívání klidových stádií organismů, s čímž souvisí úspora chemikálií i laboratorního místa, protože chovy laboratorních organismů jsou velmi často náročné. Mezi komerčně dostupné alternativní biotesty patří například Daphtoxkit (obsahuje klidová stádia *D. magna*), Thamnotoxkit (klidová stádia organismu *T. platyurus*) nebo jeho zkrácená verze Rapidtoxkit (představuje rychlý biotest, který umožňuje včasné odhalení toxikantů ve vodě) [73].

Pro účely mé diplomové práce byly vybrány následující ekotoxikologické testy:

2.9.1. Alternativní test toxicity na organismu *Thamnocephalus platyurus*

Korýš *T. platyurus* se pro zkoumání toxicity používá stále častěji z několika důvodů. Hlavními důvody je citlivost vůči chemickým látkám obdobná jako u korýše *D. magna*, dále pak možnost provedení zkoušky s neonaty vylíhlých z cyst, což nevyžaduje náročný chov živých zkušebních kultur. Metodika je popsána v normě ČSN ISO 14380.

Testovací organismy patří do řádu žábřonožek, třídy lupenonožců. Jejich tělo je bez schránky, složené z několika článků, protáhlé a měkké. Test na sladkovodním korýši je podobný metodice stanovení toxicity na perloočkách. Organismy jsou po dobu 24 hodin vystaveny působení různých koncentrací testované látky rozpuštěné v ředící vodě. Zároveň je nasazena i kontrola, ve které jsou testovací organismy vystaveny pouze účinkům standardní ředící vody. Během tohoto testu je sledována mortalita organismu v porovnání s kontrolou [73; 84]. Na obrázku 16 lze vidět ampulku s cystami a vylíhlé jedince.



Obrázek 16: Testovací organismus *T. platyurus*, upraveno dle [85]

Kultivace cyst probíhá v inkubátoru v rozmezí 20-22 hodin při stálé teplotě 25 °C a osvětlení 3 000-4 000 Lux. Do testovací destičky, která obsahuje různé koncentrace testované látky, je přenesen určitý počet jedinců, poté je destička překryta parafilmem a vložena do inkubátoru nastaveného na teplotu 25 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby jsou zaznamenáni mrtví jedinci a je vypočtena hodnota LC50 (24hLC50) [85].

2.9.1. Akutní imobilizační test na perloočkách *Daphnia magna*

Podstatou tohoto testu (metodika podle ČSN EN ISO 6341) je zjišťování vlivu toxických látek na planktonní organismy. *D. magna* (obrázek 17) je důležitou potravou pro ryby a z tohoto důvodu jsou perloočky významnou složkou biocenózy a potravního řetězce. Taxonomicky patří do řádu perlooček, podtřídy lupenonožců, třídy korýšů. Patří mezi drobné členovce o rozměrech 1-5 mm, kteří žijí převážně ve sladkých vodách a jejich potravou je plankton a organický detrit. Pro testování jsou využívány perloočky staré maximálně 24 hodin [86].

Principem testu je vystavení korýše *D. magna* účinku různých koncentrací testované látky po dobu 48 hodin, přičemž testovaná látka je rozpuštěna ve standardně připravené ředící vodě. Současně je nasazena i kontrola. Po 24 a 48 hodinách se zaznamenává počet imobilizovaných jedinců v jednotlivých koncentracích a kontrolním médiu. Na základě získaných hodnot se stanoví efektivní koncentrace EC50 (24hEC50 a 48hEC50) [87; 88].



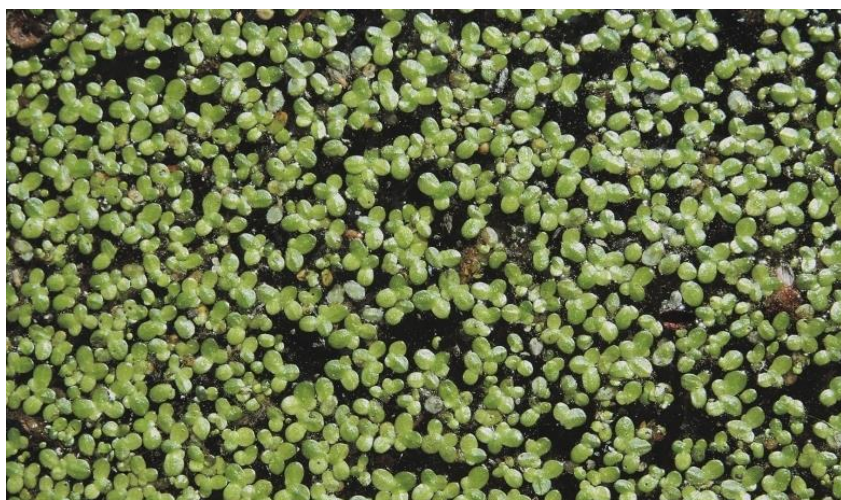
Obrázek 17: Korýš *D. magna* [107]

2.9.2. Test inhibice růstu okřehku *Lemna minor*

Okřehek a hořčice patří mezi nejčastěji používané testovací rostliny. Hořčice je suchozemská rostlina, a proto je k hodnocení účinků látek na vodní ekosystém ekologicky nerelevantní. Okřehek menší je kategorizován do oddělení krytosemenných kvetoucích, třídy jednoděložných a čeledě okřehkovitých. Metodika testování na *L. minor* vychází z doporučení OECD 122 a normy ČSN EN ISO 20079.

L. minor (obrázek 18) je drobná rostlina, která má ploché stélky, jemné kořínky a kolonie jsou tvořeny 2-5 stélkami. Okřehky porůstají hladinu stojatých vod a jsou vhodnou potravou pro ryby a vodní ptactvo. Na druhou stranu za určitých podmínek vytváří na hladině celistvý porost nepropouštějící světlo, což má za následek zhoršení jakosti vod pod nimi.

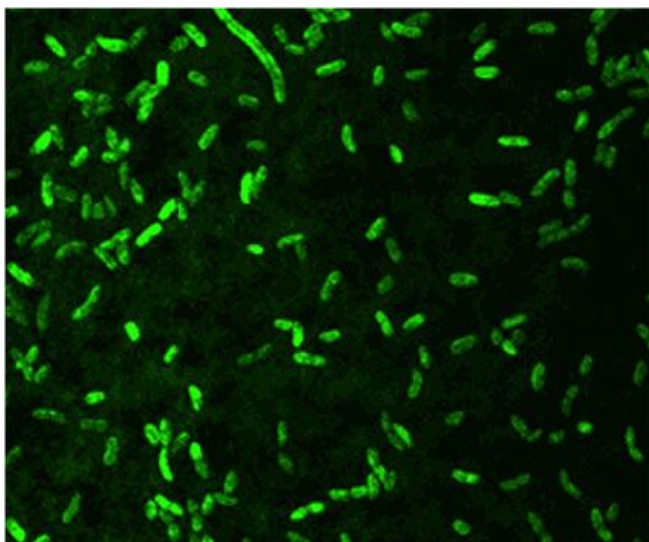
Rostliny okřehku jsou exponovány různým koncentracím testované látky rozpuštěné v Steinbergově živném roztoku po dobu 7 dní. Zároveň je pozorován jejich růst i v kontrolním médiu, což je živný roztok neobsahující testovanou látku. Je důležité, aby počet stélek v kádince byl na začátku testu stejný. Stélky musí být vybírány ze zdravé populace a měly by být stejně velké. Po určitých časových intervalech je zaznamenáván stav rostlin a počet stélek. Účelem testu je popsát účinky na vegetativní růst okřehku posouzením počtu lístků, rychlosti růstu a zhodnocení hmotnosti čerstvé nebo suché biomasy. Výsledkem je stanovení koncentrace IC50 na základě srovnání růstu v testovaných roztocích a kontrole. Za vhodných podmínek testu mohou být stanoveny i hodnoty LOEC a NOEC [73; 87; 89; 90].



Obrázek 18: Rostlina *L. minor* [106]

2.9.3. Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi *Vibrio fischeri*

Test inhibice bioluminiscence mořské bakterie *V. fischeri* (obrázek 19) se provádí podle normy ČSN EN ISO 11348-3. Bakterie je díky své bioluminiscenci používána ke snadnému, rychlému a spolehlivému sledování toxicity chemických látek. Tato mořská, gramnegativní bakterie přirozeně emituje světlo, které vzniká v organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferasou. Cílem testu je srovnání bioluminiscence bakterií před a po expozici testované látky. Snížení luminiscence se zaznamenává po 15 a 30 minutách při teplotě 15 °C. Vhodným zvolením koncentrační řady lze získat koncentraci, při které je inhibice minimální (LOEL) až po koncentraci, která způsobí úplné zhasnutí (LC) [91; 92].



Obrázek 19: Bakterie *V. fischeri* [92]

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Moje diplomová práce byla zaměřená nejenom na posouzení případné ekotoxicity umělých sladidel, ale zabývala se i stanovením těchto látek na čistírně odpadních vod s cílem zjistit, v jakých přibližných koncentracích jsou na ČOV přiváděna a jaké koncentrace následně pronikají do životního prostředí. Z těchto důvodů je experimentální část práce a diskuze výsledků rozdělena do dvou částí. První část se zabývá stanovením sladidel na ČOV a ve druhé části je řešena problematika jejich výskytu v ekosystému.

3. ANALÝZA UMĚLÝCH SLADIDEL

3.1. Použité přístroje a pomůcky

- kapalínový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)
- hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 6320 Series Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, USA)
- generátor dusíku N418LA, Peak Scientific
- kolona Ascentis Express C18, HPLC column 15 cm x 2,1 mm, velikost částic 2,7 μm , s předkolonou
- Zařízení pro SPE – Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold, Sigma-Aldrich
- SPE kolonky
 - SELECT HLB SPE 200 mg/6 ml, (Supelco, USA)
 - STRATA-X 33 μ Polymeric Reversed Phase 200 mg/3 ml, (Chromservis, s.r.o., Praha)
- přístroj pro odpařování pod dusíkem EVATERM (Labicon s.r.o., ČR)
- mikrofiltry
 - PTFE 13 mm, 0,45 μm , pk/100, (Labicom s.r.o., ČR)
 - PTFE 4 mm, 0,2 μm Dk blue, pk/100, (SMI-LabHut Ltd., Spojené království Velké Británie)
- zařízení pro čištění vody Millipore Academic
- standardní laboratorní vybavení

3.2. Použité chemikálie

- aceton SupraSolv, CAS: 67-64-1, (Merck KGaA, Německo)
- acetonitril HPLC Far UV/Gradient Grade, Baker HPLC analyzed, CAS: 75-05-8, (J. T. Baker, Spojené království Velké Británie)
- kyselina chlorovodíková 35%, CAS: 7647-01-0 (Penta, Chrudim, Česká republika)
- kyselina octová, čistota $\geq 98\%$, CAS: 64-9-7, (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina mravenčí, čistota $\geq 98\%$, CAS: 64-18-6, (Sigma-Aldrich, Německo)
- octan amonný, čistota $\geq 99\%$, (Sigma-Aldrich, Nizozemsko)
- methanol HPLC Gradient Grade, Baker HPLC analyzed, CAS: 67-56-1, (J. T. Baker, Nizozemsko)
- Milli-Q voda

3.3. Použité standardy

- acesulfam-K – čistota $\geq 99,0$ %, CAS: 55589-62-3, Sigma-Aldrich, Německo
- cyklamát – čistota $\geq 98,9$ %, CAS: 139-05-9, Supelco, USA
- sacharin – čistota > 99 %, CAS: 81-07-2, Sigma-Aldrich, Jižní Korea
- sukralosa – čistota $> 98,0$ %, CAS: 56038-13-2, Sigma-Aldrich, Čína
- sukralosa-d6 – CAS: 1459161-55-7, Toronto Research Chemicals, Kanada

3.4. Použité plyny

- helium 5.0, Linde Gas a.s.
- dusík 4,7, SIAD Czech spol. s.r.o.

3.5. Vzorkovaná lokalita

Pro účely diplomové práce byly odebírány vzorky z čistírny odpadních vod v Modřicích. Tyto vzorky byly odebírány na přítoku a na odtoku již přečištěné vody do recipientu, kterým je řeka Svratka.

Na čistírnu odpadních vod jsou k čištění přiváděny odpadní vody systémem kanalizačních stok z města Brna. V současné době jsou na čistírnu prostřednictvím soustavy čerpacích stanic připojeny další města a obce z okolí Brna. Původní čistírna byla uvedena do provozu v roce 1961 a jednalo se o klasickou dvoustupňovou čistírnu s anaerobní stabilizací kalu. Během postupného rozšiřování města docházelo k hydraulickému i látkovému přetížení, a proto musela být ČOV nejprve rozšířena a následně v letech 2001-2004 kompletně zrekonstruována a rozšířena. V současné době čistírna odpadních vod splňuje podmínky české i evropské legislativy a zároveň je zajištěna dostatečná kapacita ČOV i pro rozvoj a rozšiřování města Brna a jeho okolí.

Kapacita čistírny je vyjádřena počtem ekvivalentních obyvatel – 1 ekvivalentní obyvatel představuje produkci znečištění 60 g BSK₅ za den. ČOV v Modřicích má kapacitu 513 000 EO. Přípustné množství vypouštěných odpadních vod je 4,222 m³/s, přičemž při vyšším průtoku (za deště) je dešťová voda nejprve kumulována v dešťové zdrži a až po skončení deště je přečerpávána zpět do ČOV [93; 94].

3.5.1. Odběr vzorků a jejich úprava

Slévané 24hodinové vzorky byly odebírány na čistírně odpadních vod v Modřicích pomocí automatického odběrového zařízení s intervalem odběru dílčích vzorků 2 hodiny. Celkově tak byly analyzovány vzorky ze tří dnů odebíraných v rozmezí deseti dnů.

Pro potřebu analýzy bylo přefiltrováno 3x100 ml vzorku odebíraného z přítoku a 3x100 ml vzorku odebíraného z odtoku. Po filtraci byl vzorek okyselen na pH 4 a byl k němu přidán deuterovaný standard sukralosy-d6, který sloužil k posouzení výtěžnosti separace. Jakmile byl vzorek takto upraven, byla provedena extrakce tuhou fází popsána v následující kapitole.

3.6. Optimalizace metody extrakce tuhou fází (SPE)

Pro optimalizaci SPE byly použity následující kolonky:

- Supelco – Select HLB SPE, 200 mg/6 ml
- Chromservis – STRATA-X, 200 mg/3 ml

Pro počáteční vyhodnocení výtěžnosti kolonky byl použit modelový vzorek o stejné koncentraci jako zásobní roztok směsného standardu (10 µg/ml). Metody extrakce jsou popsány v tabulce 2. Každá metoda byla vyzkoušena na obou kolonkách.

Směsný standardu o koncentraci 10 µg/ml byl připraven z jednotlivých roztoků sladidel o koncentraci 1 mg/ml v methanolu. Z těchto připravených roztoků bylo odebíráno 100 µl do 10 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku. K doplnění odměrné baňky byla použita různá rozpouštědla – Milli-Q voda, směs Milli-Q vody a acetonitrilu a methanol.

Tabulka 2: Optimalizace SPE

SPE	METODA 1	METODA 2	METODA 3	METODA 4
kondicionace	5 ml MeOH	5 ml MeOH	3x3 ml MeOH	3x3 ml MeOH
	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O, pH 2 ¹⁾	3x3 ml H ₂ O, pH 3 ¹⁾	3x3 ml H ₂ O, pH 4 ²⁾
vzorek	50 ml	50 ml, pH 2 ¹⁾	100 ml, pH 3 ¹⁾	100 ml, pH 4 ²⁾
promytí	2 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O, pH 2 ¹⁾	3 ml H ₂ O, pH 3 ¹⁾	3 ml H ₂ O, pH 4 ²⁾
sušení	30 minut, vakuum	30 minut, vakuum	30 minut, vakuum	30 minut, vakuum
eluce	6 ml MeOH	2 ml MeOH	3x3 ml MeOH	3x3 ml MeOH
odpaření	N ₂ , 40 °C	N ₂ , 40 °C	N ₂ , 40 °C	N ₂ , 40 °C
rozpuštění	1 ml MeOH	1 ml MeOH/H ₂ O (25/75)	1 ml MeOH/H ₂ O (25/75)	1 ml MeOH/H ₂ O (25/75)

¹⁾ okyselené HCOOH

²⁾ okyselené HCl

3.7. Optimalizace separace

3.7.1. Optimalizace kapalinového chromatografu

V tabulce 3 jsou uvedena stanovovaná sladidla a jejich charakteristické hodnoty m/z při analýze pomocí LC/MS.

Tabulka 3: Poměry m/z jednotlivých sladidel

sladidlo	m/z
acesulfam-K	162
sacharin	182
cyklamát	178
sukralosa	433



Obrázek 20: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series a hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 6320 Series Ion Trap LC/MS

K separaci umělých sladidel byla použita kolona Ascentis Express C18 (15 cm x 2,1 mm, 2,7 μm). Pro jejich separaci byla využita gradientová eluce s dvousložkovou mobilní fází. V literatuře je nejčastěji popisována mobilní fáze ve složení voda a methanol nebo voda a acetonitril, přičemž je do vody nebo do obou složek mobilní fáze přidáván octan amonný nebo mravenčan amonný z důvodu potlačení disociace sledovaných analytů. Další možností je použití okyselené mobilní fáze pro potlačení disociace separovaných látek, což vede ke zvýšení jejich retence na nepolární stacionární fázi.

V prvním pokusu optimalizace kapalinového chromatografu byla zvolena dvousložková mobilní fáze:

složka A: acetonitril
složka B: Milli-Q voda

Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Počáteční podmínky separace, metoda sweet_1

Podmínky separace LC			
nástřik	10 μ l		
teplota kolony	35 °C		
průtok MF	0,250 ml/min		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	40	60
	15	90	10
	20	90	10
	21	40	60

Tato kombinace byla nevyhovující, protože sladidla acesulfam-K, cyklamát a sacharin byla eluována v přibližně stejném čase, a tudíž nedošlo k rozdělení jejich píků, viz příloha 1, obrázek 24.

V dalším pokusu optimalizace byla zvolena mobilní fáze:

složka A: methanol
složka B: Milli-Q voda + 1 mM octan amonný

Počáteční podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Počáteční podmínky separace, metoda sweet_3

Podmínky separace LC			
nástřik	10 μ l		
teplota kolony	35 °C		
průtok MF	0,250 ml/min		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	5	95
	15	70	30
	20	70	30
	21	5	95

Při těchto podmínkách se první tři píky již rozdělily, ale vzhledem k jejich deformaci byl nadále upravován nástřík, pro optimální rychlost eluce byl postupně upravován gradient. Poměrně vyhovující metoda je popsána v tabulce 6. Ukázka chromatogramu je uvedena v příloze 1 jako obrázek 25.

Tabulka 6: Podmínky separace, metoda sweet_07

nástřík	2 μ l		
teplota kolony	35 °C		
průtok MF	0,250 ml/min		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	12	88
	5	32	68
	8	80	20
	10	80	20
	11	12	88

Vzhledem k tomu, že první tři píky byly stále blízko sebe a změnou různých parametrů nebylo dosaženo uspokojivé eluce, byla v průběhu optimalizace vyzkoušena další mobilní fáze:

složka A: acetonitril + aceton (95+5), okyseleno 0,01% CH₃COOH

složka B: Milli-Q voda + methanol + aceton (75+20+5), okyseleno 0,01% CH₃COOH

Přídavek malého množství acetonu do obou složek mobilní fáze by měl mít za následek zúžení píků. Použití dvou organických složek v mobilní fázi by mělo mít za následek lepší separaci.

Počáteční podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Počáteční podmínky separace, metoda sweet_14

nástřík	2 μ l		
teplota kolony	40 °C		
průtok MF	0,250 ml/l		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	0	100
	10	30	70
	15	70	30
	16	70	30
	17	0	100

Při těchto podmínkách analýzy byly píky acesulfamu-K a sacharinu slité a deformované, proto byl postupně upravován nástřík a teplota kolony. Za těchto podmínek se nepodařilo získat uspokojivé výsledky, proto byl upraven zásobní roztok sladidel. Vzhledem ke složení mobilní

fáze byl připraven směsný standard ve směsi voda/acetonitril v poměru 60/40. Tyto pokusy optimalizace byly neúspěšné, proto došlo ke změně mobilní fáze:

složka A: acetonitril + 2 mM CH₃COOH
složka B: Milli-Q voda + 2 mM CH₃COOH

Během analýz byly opět upravovány parametry nástřiku vzorku, průtoku mobilní fáze, teploty kolony a gradientu. Při použití této mobilní fáze nebyly získány vyhovující výsledky, a tak byla vyzkoušena následující mobilní fáze:

složka A: acetonitril
složka B: Milli-Q voda, okyseleno HCOOH na pH 2,5

Pro analýzu byl opět použit směsný standard ve směsi voda/acetonitril v poměru 60/40. Při počátečních podmínkách separace byly píky široké a sladidla byla eluována poměrně blízko sebe, proto byly postupně upravovány parametry – nástřik, průtok, teplota kolony a gradient. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Podmínky separace, metoda sweet 20

nástřik	2 µl		
teplota kolony	30 °C		
průtok MF	0,250 ml/l		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	10	90
	15	70	30
	16	70	30
	17	10	90

Optimalizací parametrů se nepodařilo dosáhnout uspokojivých výsledků – druhé a třetí sladidlo bylo eluované velmi blízko sebe, viz obrázek 26, který je uveden v příloze 1.

Další vyzkoušenou mobilní fází byla:

složka A: methanol
složka B: Milli-Q voda okyselená HCOOH na pH 2-3

Pro analýzu byl opět použit směsný standard ve směsi voda/acetonitril v poměru 60/40, později byl směsný standard připraven v methanolu. Počáteční podmínky separace jsou popsány v tabulce 9.

Tabulka 9: Počáteční podmínky separace, metoda sweet_27

nástřik	2 μ l		
teplota kolony	30 °C		
průtok MF	0,250 ml/l		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	10	90
	15	70	30
	16	70	30
	17	10	90

Při těchto podmínkách byly výsledky uspokojivé, ale pro zrychlení analýzy byla zvýšena teplota a urychlen gradient. Parametry metody jsou uvedeny v tabulce 10. Porovnání těchto dvou metod je patrné z obrázku 27 v příloze 1.

Tabulka 10: Podmínky separace, metoda sweet_30

nástřik	2 μ l		
teplota kolony	35 °C		
průtok MF	0,250 ml/l		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	10	90
	10	70	30
	11	70	30
	12	10	90

Vzhledem k tomu, že při dalších analýzách bylo naměřeno vysoké pozadí, byla vyzkoušena mobilní fáze stejná jako v předešlém případě s tím rozdílem, že k okyselení vody byla použita kyselina octová. Ostatní podmínky separace zůstaly stejné. Tato metoda byla popsána jako sweet_39. Výsledný chromatogram je uveden v příloze 1 jako obrázek 28.

složka A: methanol

složka B: Milli-Q voda okyselená CH₃COOH na pH 2,5

3.7.2. Optimalizace LC/MS/MS

Během optimalizace kapalinového chromatografu byla u některých metod zároveň vyzkoušena také optimalizace MS/MS, ale vzhledem k neuspokojivým výsledkům zde nejsou všechny metody uváděny. V prvním kroku bylo snímáno celkové spektrum pro všechna sladidla a následně produktové spektrum pro každé sladidlo zvlášť. Z tohoto spektra byly získány produktové ionty jednotlivých sladidel a kolizní energie, při kterých byly tyto ionty získány. Zjištěné produktové ionty všech sladidel jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Produktové ionty

sladidlo	prekurzor m/z	produkt m/z
acesulfam-K	162	82
sacharin	182	106
cyklamát	178	80
sukralosa	433	397/359

Pro MS/MS byla připravena metoda, která zahrnovala rozdělení analýzy do jednotlivých segmentů dle retenčního času analytů. Byly nastaveny parametry rozsahu skenování, šířky okna, kolizní energie a množství iontů dávkovaných do iontové pasti. Příklad vyzkoušené metody je uveden v tabulce 12.

Tabulka 12: Optimalizace LC/MS/MS, metoda sweet_31

segment	čas [min]	hmota	fragment	scan	šířka	kolizní E
1	0-3,3	162	82	20-200	1,2	0,26
2	3,3-5,5	182	106	20-300	1,2	0,35
3	5,5-8,0	178	80	20-300	1,2	0,35
4	8,0-12,0	395	359	50-500	1,2	0,25
množství iontů v pasti		20 000				

V tomto případě byly nevhodně zvolené kolizní energie a metoda poskytovala nevyhovující produktová spektra.

Vzhledem k tomu, že se nedařilo optimalizovat metodu pro LC/MS/MS s použitými mobilními fázemi, byl do hmotnostního spektrometru postkolonově přidán pufr TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethan). Z literatury bylo zjištěno, že TRIS může být přidán buď přímo do mobilní fáze, nebo postkolonově až do elektrospreje hmotnostního spektrometru. Přidání tohoto pufru by mělo mít za následek zvýšení výtěžku ionizace a tedy větší odezvu. Přidání TRIS bylo vyzkoušeno u metody sweet_39. Podmínky jsou popsány v tabulce 13.

Tabulka 13: Podmínky separace, metoda sweet_42

metoda	přídavek TRIS		fragmentace			
	koncentrace	množství	segment	čas [min]	hmota	kolizní E
sweet_39	5 mM	5 μ l	1	0-2,8	162	0,30
			2	2,8-4,1	182	0,30
			3	4,1-7,0	178	0,30
			4	7,0-12,0	433	0,35

Vzhledem k tomu, že nedošlo k výraznějším změnám, bylo za stejných podmínek vyzkoušeno přidání 1 mM TRIS a 20 mM TRIS. Ani v těchto případech nedošlo ke zlepšení odezvy, a proto bylo od tohoto postupu odstoupeno a další optimalizace probíhala již bez přídavku TRIS.

V dalších krocích se vycházelo z metody sweet_39 a byly postupně upravovány parametry kolizních energií a množství iontů vpuštěných do pasti tak, aby bylo získáno uspokojivé produktové spektrum, ze kterého by bylo možno vybrat dostatečně intenzivní fragment. To se bohužel nepodařilo, proto bylo v konečném důsledku přistoupeno pouze k analýze LC/MS. V příloze 2 jsou uvedena produktová spektra pro acesulfam-K, ze kterých lze vidět, že při stejně zvolených podmínkách analýzy vždy docházelo k naměření rozdílných spekter.

Pozn.: Pro optimalizaci LC/MS/MS byly vyzkoušeny metody popsané v literatuře, jejichž použití bylo úspěšné. V těchto metodách byl jako analyzátor použit trojitý kvadrupól, který se vyznačuje vysokou citlivostí. V laboratoři je k dispozici hmotnostní spektrometr se sférickou iontovou pastí, která má v porovnání s trojitým kvadrupólem výrazně nižší citlivost, což může být jeden z důvodů, proč se nedařilo LC/MS/MS optimalizovat.

3.7.3. Analytické parametry

Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody je charakterizována směrodatnou odchylkou, která představuje rozptýlení jednotlivých hodnot okolo průměrné hodnoty všech měření. Pro stanovení opakovatelnosti metody byl 10x analyzován vzorek přítoku. Z ploch jednotlivých píků byla stanovena opakovatelnost metody jako relativní směrodatná odchylka.

Mez detekce

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významný od šumu, tzn. mez detekce je parametr, který udává, jaké nejmenší množství analytu může být detekováno. Vyjadřuje se jako trojnásobek šumu základní linie, viz rovnice (1).

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m}, \text{ kde} \quad (1)$$

h_n šum na základní linii
 m směrnice kalibrační křivky

Mez kvantifikace

Mez kvantifikace odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že umožňuje kvantitativní vyhodnocení. Vyhodnocuje se jako desetinásobek šumu základní linie, viz (2).

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}, \text{ kde} \quad (2)$$

h_n šum na základní linii
 m směrnice kalibrační křivky

4. VÝSLEDKY A DISKUZE ANALYTICKÉ ČÁSTI

4.1. Optimalizace SPE

Nejvyšší výtěžnost dosahovala metoda č. 4 s kolonkou STRATA-X, tato metoda je popsána v tabulce 14.

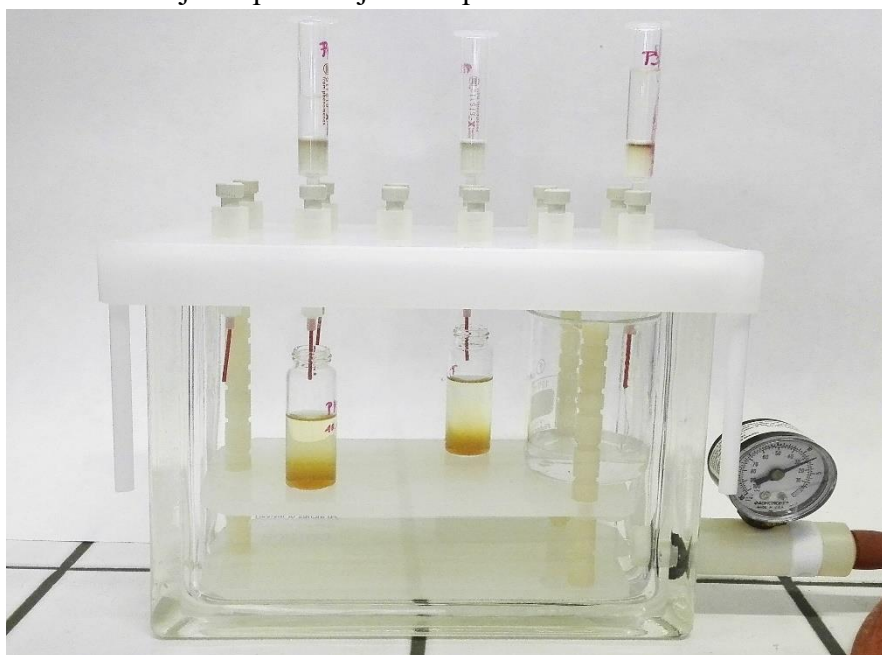
Tabulka 14: Optimalizovaná metoda SPE

SPE	METODA 4
kondicionace	3x3 ml MeOH
	3x3 ml H ₂ O, pH 4 ¹⁾
vzorek	100 ml, pH 4 ¹⁾
promytí	3 ml H ₂ O, pH 4 ¹⁾
sušení	30 minut, vakuum
eluce	3x3 ml MeOH
odpaření	N ₂ , teplota 40 °C
rozpuštění	1 ml MeOH/H ₂ O (25/75) ²⁾

¹⁾ okyselené HCl

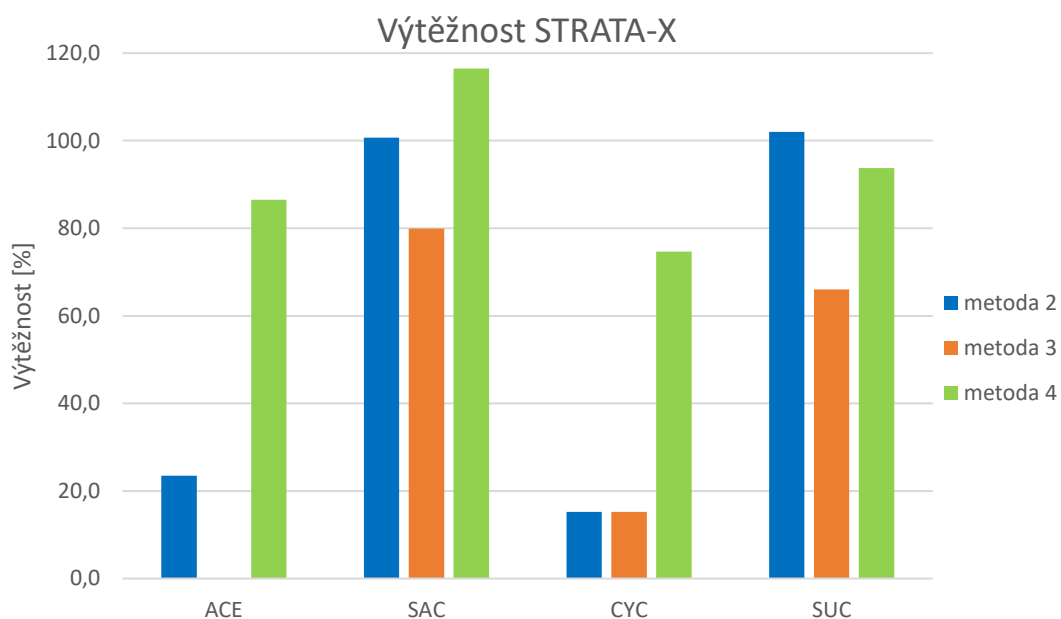
²⁾ vzorky z druhého a třetího dne byly rozpuštěny v 200 µl směsi

Po analýze vzorků z prvního dne byly (na odtoku z ČOV) koncentrace umělých sladidel pod mezí detekce, proto byla metoda pro analýzu vzorků z dalších dnů mírně upravena. Úprava spočívala v rozpuštění analytů po odpaření pod dusíkem. V prvním případě byl odparek rozpuštěn ve směsi methanol/voda do 1 ml. Po úpravě metody byl odparek rozpuštěn do 200 µl směsi methanol/voda ve stejném poměru jako v optimalizované metodě.



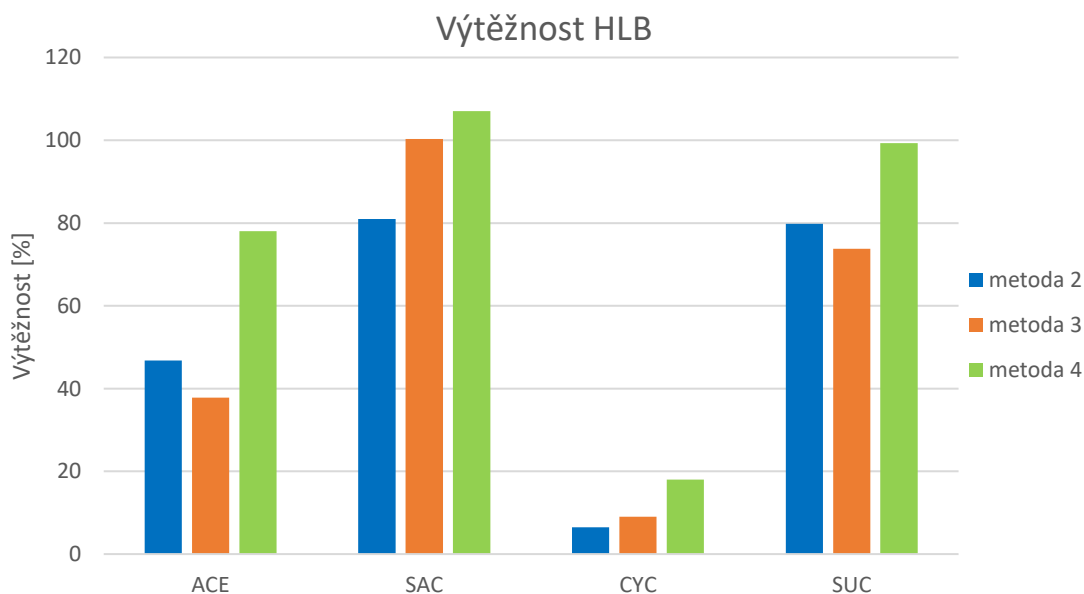
Obrázek 21: Zařízení pro SPE - Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold

Výtěžnosti použitých metod na různých kolonkách porovnávají graf 1 a graf 2. V grafech není zahrnuta metoda č. 1, protože při této variantě nedošlo k zachycení všech sladidel, pouze sukralosy.



Graf 1: Porovnání výtěžností použitých metod na kolonce STRATA-X

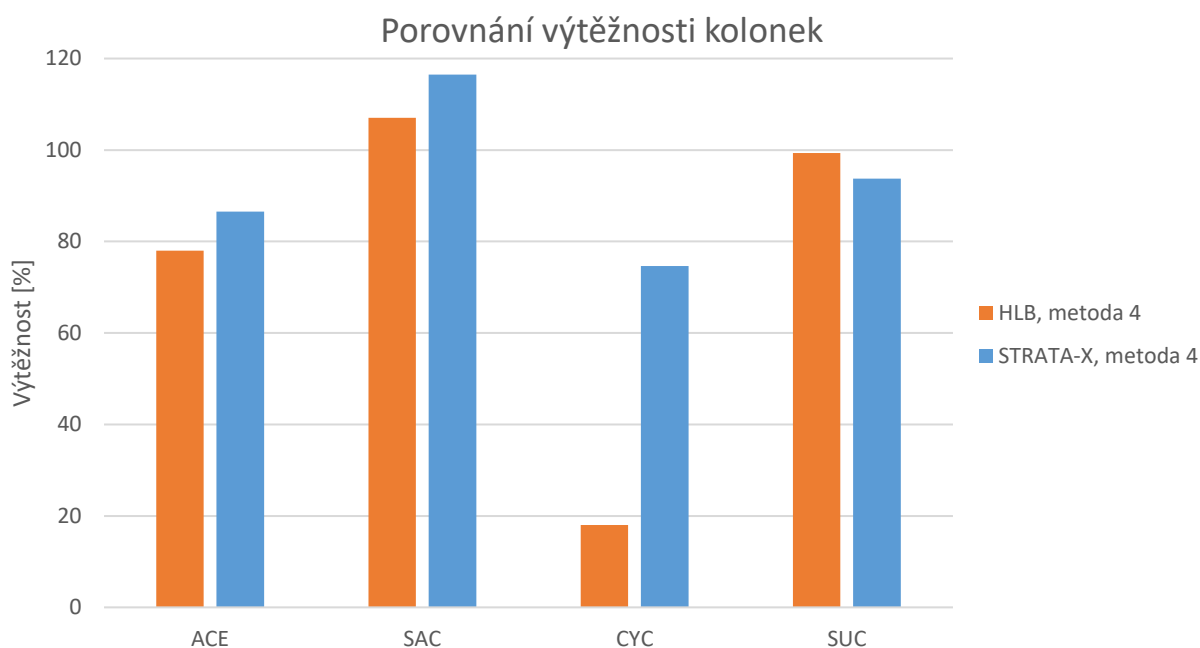
Z grafu 1 je vidět, že pro sladidla ACE, CYC a SAC představuje nejvyšší výtěžnost metoda č. 4. V případě ACE a CYC je výrazně lepší než zbývající dvě metody. Pro zakoncentrování SUC byla nejlepší metoda č. 2, nicméně výtěžnost metody č. 4 byla pouze o 8,25 % horší. Vzhledem k tomu, že i tak byla výtěžnost 93,75 %, byla metoda č. 4 zvolená jako nevhodnější.



Graf 2: Porovnání výtěžností použitých metod na kolonce HLB

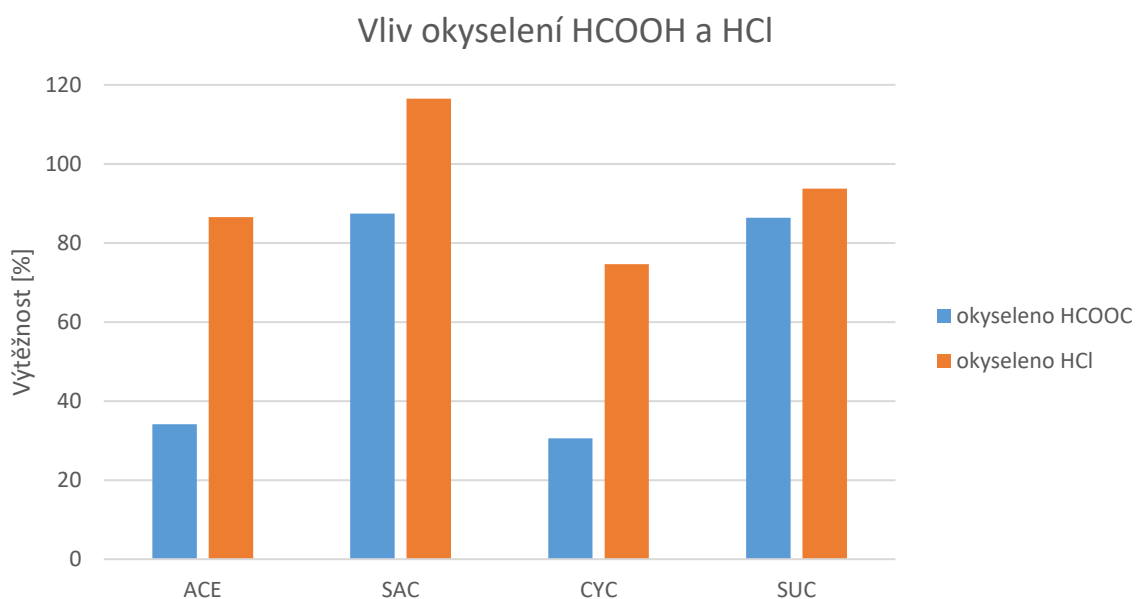
V případě optimalizace metody na kolonce HLB byla ve všech případech nejvhodnější metoda č. 4.

Při porovnání obou kolonek bylo zjištěno, že lepších výsledků dokazuje kolonka STRATA-X, jak ilustruje graf 3.



Graf 3: Porovnání výtěžností kolonky HLB a STRATA-X

Pro porovnání výtěžnosti v závislosti na způsobu okyselení vody byla vyzkoušena metoda č. 4 s kolonkou STRATA-X. V jednom případě bylo pH upraveno kyselinou mravenčí a v druhém případě bylo pH upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové. Z grafu 4 lze vidět, že lepší výtěžnosti bylo dosaženo v případě okyselení HCl.



Graf 4: Vliv okyselení pomocí HCOOH a HCl

Uspokojivou výtěžnost pro všechna umělá sladidla poskytovala metoda č. 4 na kolonce STRATA-X. Pro přesnější určení výtěžnosti kolonky byly připraveny dvě kalibrační řady a byla provedena extrakce vzorků obsahujících sladidla o koncentraci 10 µg/ml v prvním případě a 1 µg/ml v případě druhém. Byla zvolena třibodová kalibrační řada o následujících koncentracích sladidel: 1; 10 a 25 µg/ml, respektive 0,5; 1 a 5 µg/ml. Výtěžnost kolonky je uvedena v tabulce 15 a v tabulce 16. Kalibrační závislosti sladidel jsou uvedeny v příloze 3.

Tabulka 15: Koncentrace sladidel po SPE (metoda č. 4, STRATA-X)

vzorek s koncentrací sladidel 10 µg/ml			
sladidlo	m/z	koncentrace [µg/ml]	výtěžnost [%]
acesulfam-K	162	5,10	51,0
sacharin	182	9,90	99,9
cyklamát	178	7,02	70,2
sukralosa	433	10,24	102,4

Tabulka 16: Koncentrace sladidel po SPE (metoda č. 4)

vzorek s koncentrací sladidel 1 µg/ml					
kolonka		STRATA-X		HLB	
sladidlo	m/z	koncentrace [µg/ml]	výtěžnost [%]	koncentrace [µg/ml]	výtěžnost [%]
acesulfam-K	162	0,34	34	0,36	36
sacharin	182	0,99	99	0,72	72
cyklamát	178	0,59	59	0,11	11
sukralosa	433	1,08	108	0,78	78

Pro extrakci nižších koncentrací byla vedle kolonky STRATA-X vyzkoušena i kolonka HLB. Kolonka STRATA-X byla vyhodnocena jako účinnější i přesto, že výtěžnost acesulfamu-K byla mírně nižší. Naopak pro všechna ostatní sladidla byla výtěžnost na kolonce STRATA-X vyšší.

4.2. Optimalizace separace

Na základě všech pokusů optimalizace kapalinového chromatografu byla vybrána metoda označená jako sweet_39. Parametry kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 17: Optimalizovaná metoda LC/MS

Kapalinový chromatograf			
mobilní fáze	složka A:	CH ₃ OH	
	složka B:	Milli-Q voda, pH 2,5, okyseleno CH ₃ COOH	
nástrík	2 µl		
teplota kolony	35 °C		
průtok MF	0,250 ml/l		
gradient	čas [min]	A [%]	B [%]
	0	10	90
	10	70	30
	11	70	30
12	10	90	
Hmotnostní spektrometr			
tlak zmlžovacího plynu	25 psi		
průtok sušícího plynu	10,0 ml/min		
teplota sušícího plynu	350 °C		
rozsah skenovaných hmot	50-600 m/z		
množství iontů v pasti	20 000		
mód	negativní		

Výsledný chromatogram je uveden v příloze 1 jako obrázek 28.

4.3. Analytické parametry

Opakovatelnost metody

Metoda se dá považovat za platnou, pokud se relativní směrodatná odchylka všech výsledků, které jsou získány ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem za stejných podmínek a v krátkém časovém intervalu, pohybuje do 10 %. Relativní směrodatné odchylky pro jednotlivá sladidla jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18: Relativní směrodatná odchylka

sladidlo	RSD [%]
ACE	7,46
CYC	0,85
SAC	1,02
SUC	6,66
SUC-d6	1,83

Relativní směrodatná odchylka se pro všechna sladidla pohybuje v rozmezí 0,85-6,66 %, z čehož lze usoudit, že použitá metoda je opakovatelná, a tudíž vhodná pro stanovení AS.

Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce a mez kvantifikace byla stanovena z měření nejméně koncentrovaného roztoku, který poskytoval signál, přičemž tento signál odpovídal měřené koncentraci. Mez detekce byla stanovena jako trojnásobek šumu a mez kvantifikace jako desetinásobek šumu. Výsledné meze detekce a meze kvantifikace pro jednotlivá sladidla jsou uvedeny v tabulce 19.

Tabulka 19: Mez detekce a mez kvantifikace

sladidlo	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ [$\mu\text{g/ml}$]
ACE	0,042	0,141
CYC	0,047	0,156
SAC	0,024	0,080
SUC	0,110	0,368

4.4. Výsledky analýzy odpadní a přečištěné vody

Pro analýzu umělých sladidel byly odebírány tři slévané 24hodinové vzorky přítoku a odtoku vody z čistírny odpadních vod v Modřicích. Na základě předběžné analýzy sladidel byly naplánovány koncentrační řady pro přítok a odtok:

- přítok: 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml a 10 µg/ml
- odtok: 0,01 µg/ml; 0,05 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml a 10 µg/ml

Kalibrační závislosti jsou uvedeny v příloze 4 a v příloze 5.

Výtěžnost kolonky STRATA-X pro koncentraci 1 µg/ml je uvedena v tabulce 20.

Tabulka 20: Výtěžnost kolonky STRATA-X

kolonka	STRATA-X	
	koncentrace [µg/ml]	výtěžnost [%]
acesulfam-K	0,34	34
sacharin	0,99	99
cyklamát	0,59	59
sukralosa	1,08	108

Vzorky byly po eluci methanolem přefiltrovány přes mikrofiltry, protože obsahovaly nečistoty.

Výsledné koncentrace umělých sladidel na přítoku a odtoku vody jsou uvedeny v tabulce 21 a v tabulce 22. Výsledky nejsou zkorigovány na výtěžnost kolonky.

Tabulka 21: Koncentrace sladidel na přítoku odpadní vody

AS	c [µg/l]					
	den 1		den 2		den 3	
	vzorky	průměr	vzorky	průměr	vzorky	průměr
ACE	3,273	2,071	1,580	1,401	1,062	1,535
	1,725		0,5843		1,673	
	1,216		2,040		1,869	
CYC	14,14 ¹⁾	7,413	3,742	4,111	3,236	2,894
	4,531		3,503		2,466	
	3,566		5,086		2,980	
SAC	27,85	19,55	14,95	13,62	18,89	18,62
	16,80		13,39		18,95	
	14,00		12,53		18,03	
SUC	22,82	22,67	26,90	20,92	11,08	12,23
	25,27		18,66		13,91	
	19,91		17,19		11,70	

¹⁾ nepočítáno do průměru

Tabulka 22: Koncentrace sladidel na odtoku přečištěné vody

AS	c [µg/l]					
	den 1		den 2		den 3	
	vzorky	průměr	vzorky	průměr	vzorky	průměr
ACE	n/c	-	n/c	-	n/c	-
	n/c		n/c		0,2153	
	n/c		n/c		n/c	
CYC	n/c	-	n/c	-	n/c	-
	n/c		n/c		n/c	
	n/c		n/c		n/c	
SAC	1,883	1,266	n/c	-	n/c	0,4548
	0,3407		n/c		0,5633	
	1,575		n/c		0,3463	
SUC	22,29	22,18	20,91	20,42	10,66	10,08
	21,12		22,81		8,448	
	23,12		17,54		11,13	

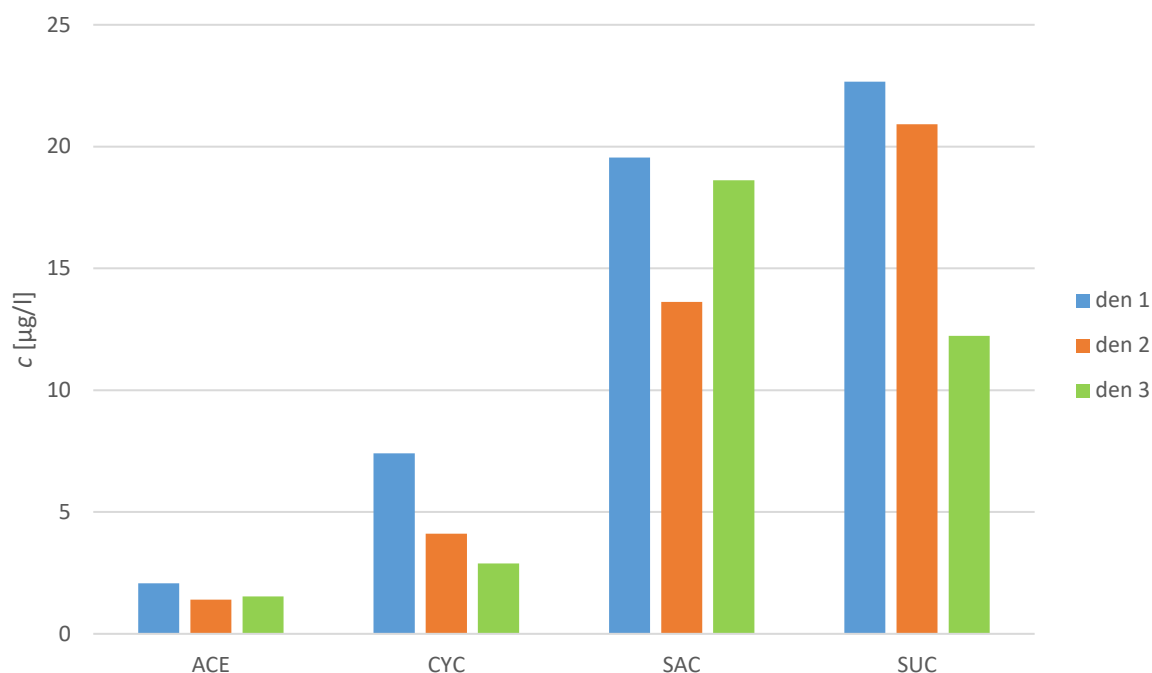
Výtěžnost separace byla hodnocena přidáním deuterovaného standardu sukralosy-d6 do všech analyzovaných vzorků. Zhodnocení výtěžnosti separace je uvedeno v tabulce 23.

Tabulka 23: Výtěžnost separace

koncentrace SUC-d6 v každém vzorku = 10 µg/ml						
vzorek	vzorky – přítok			vzorky – odtok		
	naměřená c [µg/ml]	výtěžnost [%]	průměr	naměřená c [µg/ml]	výtěžnost [%]	průměr
den 1	12,36	123,6	114,4	10,37	103,7	122,4
	12,44	124,4		14,43	144,3	
	9,531	95,32		11,90	119,0	
den 2	12,23	122,6	122,3	11,68	116,8	110,3
	10,81	108,1		12,25	122,5	
	13,65	136,5		9,166	916,6	
den 3	15,41	154,1	157,9	11,44	114,4	101,9
	14,89	148,9		9,32	93,2	
	17,06	170,6		9,80	98,0	

Výtěžnost sukralosy-d6 na přítoku 3. den byla 157,9 %, což mohlo být způsobeno interferencí, kterou by bylo možné eliminovat pomocí MS/MS, což se bohužel na starší sférické iontové pasti nepodařilo naladit.

V grafu 5 jsou porovnány koncentrace sladidel na přítoku odpadní vody v jednotlivých dnech.

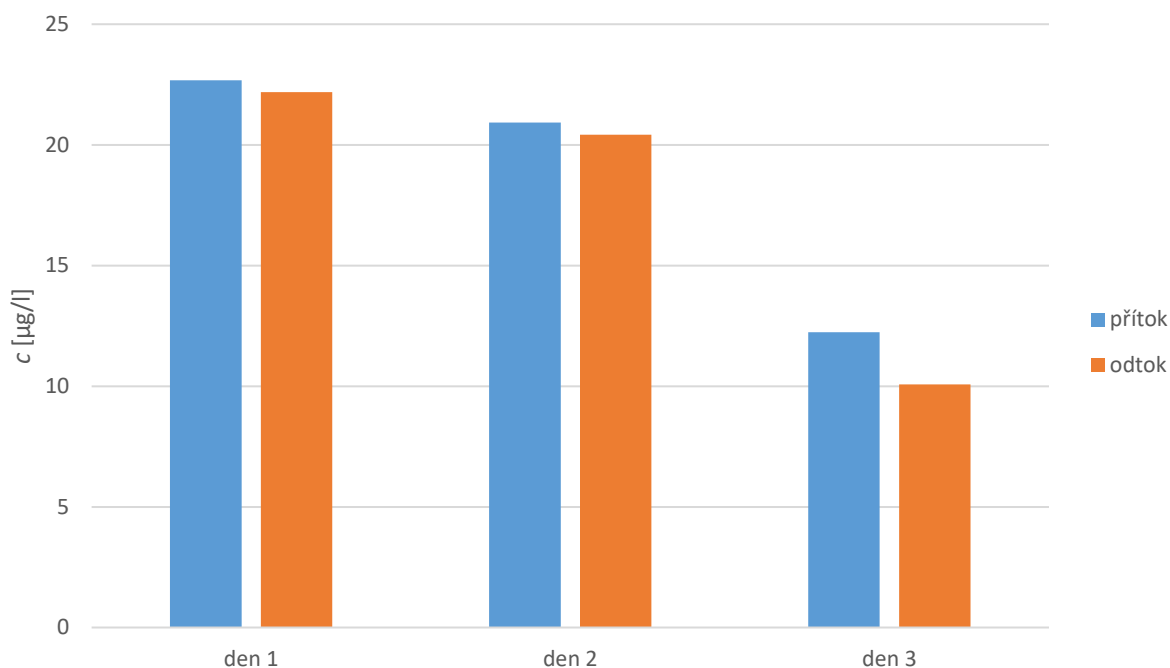


Graf 5: Porovnání koncentrací jednotlivých sladidel na přítoku odpadní vody

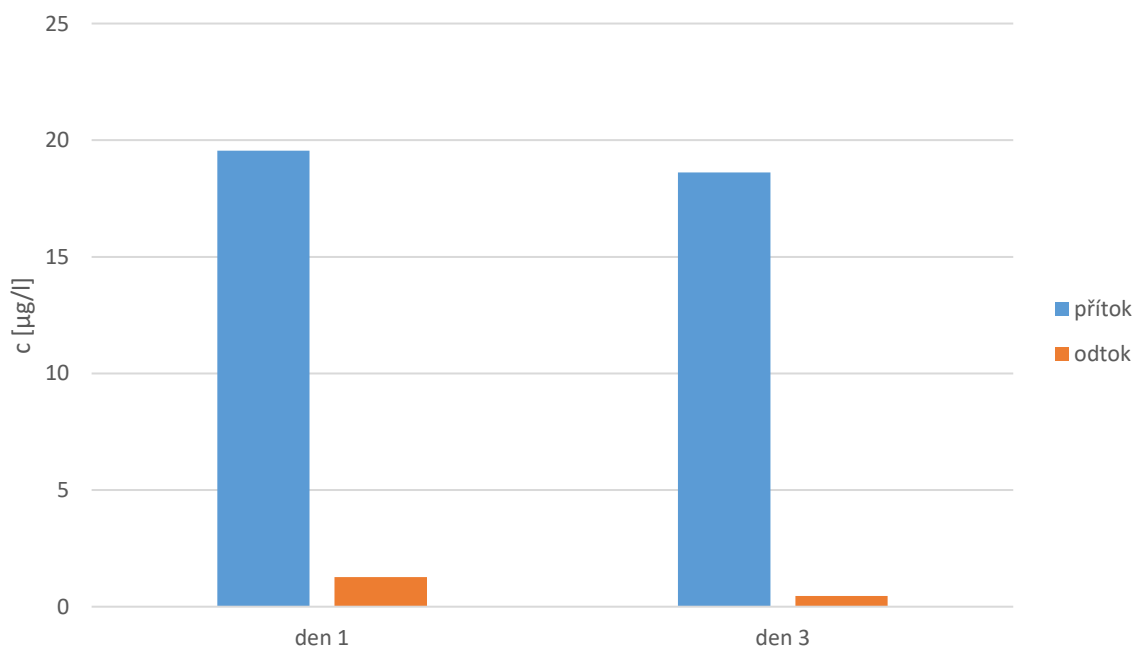
Ze získaných výsledků lze vidět, že se na čistírnu v nejvyšších koncentracích dostávala sukralosa, v průměru se jedná o koncentraci 18,61 µg/l, následovaná sacharinem (průměrná koncentrace je 17,26 µg/l). Acesulfamu-K i cyklamátu bylo méně, průměrná koncentrace na přítoku odpadních vod byla 1,669 µg/l pro acesulfam-K a 4,806 µg/l pro cyklamát. Výsledky mé diplomové práce vcelku odpovídají výsledkům studie, která se zabývala stanovením acesulfamu-K, sacharinu a sukralosy na přítoku i odtoku z dvou ČOV ve státě New York v USA. Koncentrace sukralosy se pohybovaly v rozmezí 25,9-33,0 µg/l, sacharinu průměrně kolem 16,4 µg/l a acesulfamu-K 1,08 µg/l. Nicméně byly provedeny také studie, které mapovaly koncentrace v zemích Evropské unie – Švýcarsku, Německu a Švédsku. Průměrné koncentrace sukralosy ve Švýcarsku a ve Švédsku se pohybovaly kolem 10 µg/l, v Německu pak pouze kolem 1 µg/l. Sacharin byl nalezen v průměrném množství 15 µg/l, acesulfam-K se ve všech zemích vyskytoval v koncentracích kolem 50 µg/l a cyklamát v rozmezí koncentrací 10-100 µg/l.

Z literárních poznatků vyplývá, že sukralosa čistírnou prochází bez významnějšího odstranění, což potvrzují i výsledky mé diplomové práce, kdy na ČOV v Modřicích docházelo k pouze minimální eliminaci. Dalším sladidlem, které ČOV prochází více méně beze změny, je acesulfam-K. Ve výsledcích mé diplomové práce bylo stanoveno pouze malé množství acesulfamu-K, přičemž na odtoku byly koncentrace pod mezí detekce metody. Co se týká sacharinu a cyklamátu, bylo dokázáno, že jsou tato sladidla odstraňována z více než z 90 %, což také odpovídá výsledkům mé diplomové práce.

Porovnání koncentrací sukralosy na přítoku a odtoku vody je v grafu 6, pro sacharin je toto porovnání patrné z grafu 7.



Graf 6: Porovnání koncentrací sukralosy na přítoku a odtoku



Graf 7: Porovnání koncentrací sacharinu na přítoku a odtoku

V grafu 7 lze porovnávat pouze vzorky z prvního a třetího dne, protože ve vzorcích z druhého dne nebyl sacharin na odtoku stanoven.

Ze zjištěných výsledků vyplývá, že se sladidla vyskytují na přítoku odpadních vod v koncentracích až kolem 20 µg/l. Během procesu čištění jsou odstraněny cyklamát a sacharin až s 90% účinností. Z literatury je známo, že acesulfam-K i sukralosa odstraňovány nejsou. Z výsledků mé diplomové práce je vidět, že sukralosa čistícím procesům spíše nepodléhá, nicméně to nelze s jistotou tvrdit o acesulfamu-K. Toho bylo na přítoku stanoveno pouze malé množství a na odtoku z čistírny byly koncentrace pod mezí detekce. Z tohoto faktu lze ovšem usoudit, že určitý podíl acesulfamu-K je odstraňován.

5. EKOTOXIKOLOGICKÉ POSOUZENÍ

K ekotoxikologickému posouzení byly použity následující standardy umělých sladidel:

- Acesulfam-K – CAS: 55589-62-3, ≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Cyklamát – Sodium Cyclamate, CAS: 139-05-9, ≥ 98,9 %, Supelco, USA
- Sacharin – CAS: 81-07-2, ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Jižní Korea
- Sukralosa – CAS: 56038-13-2, ≥ 98,0 %, Sigma-Aldrich, Čína
- Lékořice – CAS: 53956-04-0, ≥ 95,0 %, Sigma-Aldrich, Čína

Ačkoli informace o toxicitě umělých sladidel jsou nedostatečné, z dostupných studií vyplývalo, že jejich toxicita není příliš vysoká. Z těchto důvodů byla pro všechna sladidla v úvodním testu pro živočišné organismy zvolena následující koncentrační řada: 100; 200; 400; 800 a 1 600 mg/l. Pro rostlinného zástupce 100; 300; 900 a 1 800 mg/l a pro zástupce destruentů byl proveden screeningový test s koncentrací sladidel 1 000 mg/l.

5.1. Alternativní test toxicity Thamnotoxkit FTM na organismu *T. platyurus*

Umělá sladidla byla testována prostřednictvím sady alternativního testu Thamnotoxkit FTM na organismu *T. platyurus*, u kterého se po 24 hodinách odečítá mortalita a imobilizace jedinců. Z těchto údajů je následně stanovena hodnota 24hLC50.

Příprava ředící vody

Ředící voda se používá pro inkubaci cyst a jako ředící médium pro přípravu koncentrační řady vzorků. Thamnotoxkit FTM obsahuje ampulky s roztoky, které jsou k přípravě ředící vody zapotřebí. Do odměrné baňky o objemu 1 l se nalije cca 800 ml deionizované vody, ke které se následovně kvantitativně převedou ampulky s roztoky solí. Ampulky obsahovaly roztoky NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄ a KCl. Odměrná baňka se poté doplní po rysku a takto připravená ředící voda se uchovává v chladu. Před každým použitím je nutné ředící vodu provzdušnit po dobu 15 minut.

Inkubace cyst

Testovací organismy se uchovávají ve spící formě, proto je nutná před nasazením testu jejich aktivace, která se provádí hydratací ve standardní ředící vodě. Samotné líhnutí organismů se provádí ve zředěné standardní vodě. Do ampulky s cystami se přidá 1 ml zředěné standardní ředící vody a ta se poté protřepává 30 minut. Po uplynutí této doby se ampulka s cystami přenese do Petriho misky a přidá se 10 ml zředěné standardní vody. Petriho miska se uzavře a vloží do inkubátoru za stálého osvětlení 4 000 Lux a teplotě 25 °C.

Příprava vzorku

Pro předběžný test byl připraven zásobní roztok o koncentraci 2 000 mg/l rozpuštěním standardu sladidla v deionizované vodě. Pro všechna sladidla byla zvolena následující koncentrační řada: 100; 200; 400; 800; 1 600 mg/l. Jako referenční látka byl použit dichroman draselný, pro který byla zvolena koncentrační řada 0,032; 0,056; 0,100; 0,180 a 0,320 mg/l. Koncentrační řada byla připravena ředěním zásobního roztoku dichromanu o koncentraci 1 g/l.

Nasazení testu

K provedení testu slouží testovací destička, která je rozdělena do několika šachet (viz obrázek 22). Destička je horizontálně označena čísly od 1 do 6 a vertikálně písmeny A až D. Do každé šachty je nadávkován 1 ml kontrolního nebo testovaného roztoku. Sloupec označený číslem 1 slouží pro kontrolní skupinu. Následující sloupce jsou naplněny postupně od nejnižší koncentrace testované látky. Do testovacích šachet jsou ve dvou krocích přeneseny testovací organismy. Řádek označený písmenem A slouží jako „rozplavovací“ komůrky. V prvním kroku jsou organismy přeneseny mikropipetou do „rozplavovací“ komůrky a v kroku druhém je postupně 10 organismů přeneseno do dalších šachet, celkem jsou tedy pro každou koncentraci provedena tři opakování. Destička se poté překryje parafilmem, uzavře a vloží do inkubátoru o teplotě 25 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 22: Testovací destička

Vyhodnocení testu

Test je vyhodnocen po 24 hodinách. Testovací destička je vyjmuta z inkubátoru a je umístěna na světelnou desku. Spočítá se počet uhynulých jedinců pro každou koncentraci a kontrolu. Tento počet se pro každou koncentraci vyjádří v procentuálních hodnotách a poté se sestrojí graf závislosti průměrné mortality v každé koncentraci na logaritmickém tvaru koncentrace. Z rovnice lineární regrese se vypočte hodnota 24hLC20, případně 24hLC50.

Validita testu

Test je považován za platný, pokud mortalita kontrolního vzorku nepřesahuje 10 % a zjištěná hodnota LC50 pro dichroman draselný je v rozmezí 0,052-0,148 mg/l.

5.2. Alternativní test toxicity Daphtoxkit FTM na organismu *D. magna*

Umělá sladidla byla testována prostřednictvím sady alternativního testu Daphtoxkit FTM. Jedná se o test akutní toxicity na korýši *D. magna*, u kterého se po 24 a 48 hodinách odečítá mortalita a imobilizace jedinců. Z těchto údajů je následně stanovena hodnota 24hLC50 a 48hLC50.

Příprava standardní vody

Sada obsahuje ampulky roztoků solí pro přípravu ředící vody – vialka 1 NaHCO₃, vialka 2 CaCl₂, vialka 3 MgSO₄ a vialka 4 KCl. Odměrná baňka o objemu 2 l byla naplněna Milli-Q vodou zhruba do poloviny a do takto připravené odměrné baňky byly postupně přeneseny všechny vialky s roztoky. Poté byla odměrná baňka doplněna po rysku deionizovanou vodou a promíchána. Standardní voda slouží pro líhnutí organismů z ephippií a pro přípravu koncentrační řady testovaných sladidel. Tato voda musí být před každým použitím 15 minut provzdušňována.

Líhnutí ephippií testovacího organismu

Líhnutí ephippií se provádí 3 dny před začátkem toxikologického testu. Bylo zjištěno, že k největšímu líhnutí dochází mezi 72 a 80 hodinou. Stáří organismů nasazovaných do testu nesmí překročit 24 hodin. Obsah ampulky s vajíčky byl kvantitativně převeden do mikrosítka a následně byla ephippia propláchnuta kohoutkovou vodou tak, aby bylo opláchnuto veškeré konzervační médium. Všechna ephippia byla převedena do Petriho misky, která obsahovala provzdušněnou standardní vodu. Petriho miska byla vložena do inkubátoru, ve kterém probíhalo líhnutí 72-80 hodin při teplotě 20-22 °C a osvětlení 4 000 Lux.

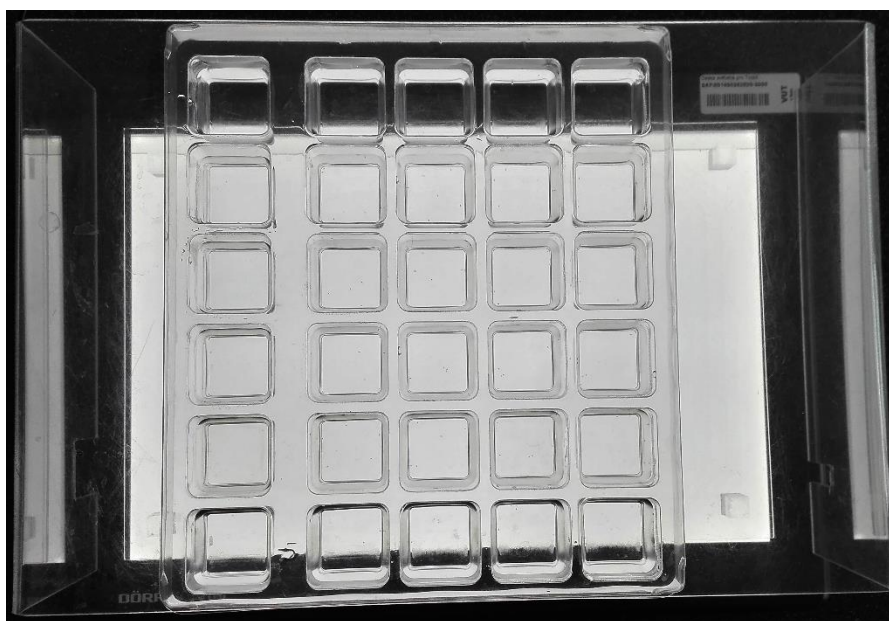
Příprava vzorku

Pro předběžný test byl připraven zásobní roztok o koncentraci 2 000 mg/l rozpuštěním standardů sladidel v deionizované vodě. Pro všechna sladidla byla zvolena následující koncentrační řada: 100; 200; 400; 800; 1 600 mg/l. Jako referenční látka byl použit dichroman draselný, pro který byla zvolena koncentrační řada 0,32; 0,56; 1; 1,80 a 3,20 mg/l. Koncentrační řada byla připravena ředěním zásobního roztoku dichromanu o koncentraci 1 g/l.

Nasazení testu

Dvě hodiny před nasazením testu musí být organismy nakrmeny, aby si vytvořily energetickou rezervu na následujících 48 hodin a předešlo se tak mortalitě z důvodu hladovění. Organismy jsou krmeny řasou Spirulina, která je v ampulce rovněž součástí testovací sady. Do ampulky byla přidána standardní voda, směs byla zhomogenizována a následně přenesena do Petriho misky s vylíhnutými dafniemi.

Pro provedení testu slouží testovací destička, která obsahuje 5x6 šachet a je založena na podobném principu jako destička pro Thamnotoxkit FTM (viz obrázek 23). První sloupec slouží jako „rozplavovací“ komora a další sloupce označeny písmeny A, B, C a D jsou pro 4 opakování. Řádky jsou označeny čísly od 1 do 6. První řádek je pro kontrolní test a další řádky jsou plněny roztoky koncentrační řady od nejnižší po nejvyšší koncentraci. Dávkovaný objem roztoků je 10 ml. Do „rozplavovací“ komůrky je z Petriho misky přeneseno 20 organismů, které jsou postupně po pěti jedincích rozděleny do čtyř šachet příslušné koncentrace. Zaplněná destička je překryta parafilmem, zakryta víkem a uchována ve tmě v inkubátoru při 20 °C.



Obrázek 23: Testovací destička

Vyhodnocení testu

Počet imobilizovaných a uhynulých jedinců je zaznamenán po 24 a 48 hodinách. Z rovnice lineární regrese grafu, ve kterém je zobrazena závislost mortality na logaritmickém vyjádření koncentrace, je vypočtena hodnota 24hEC₅₀ a 48hEC₅₀.

Validita testu

Pro hodnocení platnosti testu slouží test s referenční látkou dichromanem draselným. Byla připravena koncentrační řada dichromanu a těmito roztoky byly naplněny šachty testovací destičky. Průběh testu je stejný jako při testování umělých sladidel.

5.3. Test inhibice růstu okřešku menšího (*L. minor*)

Příprava ředící vody

Nejprve jsou připraveny zásobní roztoky makrosložek a mikrosložek, které následně slouží pro přípravu modifikovaného Steinbergova média (SM), viz tabulka 24. Navážky jsou kvantitativně převedeny do odměrných baněk, které jsou následně doplněny deionizovanou vodou po rysku.

Tabulka 24: Příprava Steinbergova média

Roztok	Makrosložky [g/l]		Roztok	Mikrosložky [mg/l]	
I.	KNO ₃	17,5	IV.	H ₃ BO ₃	120
I.	KH ₂ PO ₄	4,5	V.	ZnSO ₄ .7H ₂ O	180
I.	K ₂ HPO ₄	0,63	VI.	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	44
II.	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,0	VII.	MnCl ₂ .4H ₂ O	180
III.	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	14,75	VIII.	FeCl ₃ .6H ₂ O	760
			VIII.	EDTA	1 500

Pro přípravu modifikovaného SM se do odměrné baňky o objemu 2 l odpipetuje 40 ml každého ze zásobních roztoků č. I, II a III a poté se přidá po 2 ml zásobních roztoků č. IV, V, VI, VII a VIII. Odměrná baňka se doplní deionizovanou vodou po rysku.

Příprava vzorků

Pro testování ekotoxicity sladidel byl připraven zásobní roztok o koncentraci 2 000 mg/l rozpuštěním jednotlivých standardů v deionizované vodě. Ze zásobního roztoku byla připravena následující koncentrační řada: 100; 300; 900 a 1 800 mg/l. Jako referenční látka byl použit dichroman draselný, pro který byla zvolena koncentrační řada 0; 10; 20; 40; 80; 160 a 320 mg/l. Koncentrační řada byla připravená ředěním zásobního roztoku dichromanu o koncentraci 1 g/l.

Nasazení testu

Kádinky o objemu 150 ml byly naplněny zvolenou koncentrační řadou a kontrolním modifikovaným SM, přičemž objem testovaným roztoků byl 75 ml. Do každé kádinky byl pomocí skleněné tyčinky přenesen okřehek tak, aby výsledný počet stélek byl roven devíti. Poté se kádinky přikryly a ponechaly za stálého osvětlení 7 100 Lux. Test se prováděl v paralelním stanovení.

Vyhodnocení testu

Test je vyhodnocen na základě růstové rychlosti, která se počítá dle vztahu (3):

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_o}{t_n}, \text{ kde} \quad (3)$$

- μ růstová rychlost
- N_o počet lístků na začátku testu
- N_n počet lístků na konci testu
- t_n doba trvání testu (v hod)

Inhibice, popř. stimulace, je pro každou testovanou koncentraci vypočtena dle vztahu (4):

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100, \text{ kde} \quad (4)$$

- I_μ inhibice pro danou odpadní vodu
- μ_c růstová rychlost v kontrole
- μ_i růstová rychlost v testované odpadní vodě

Validita testu

Výsledky testu jsou považovány za platné, pokud průměrný počet lístků v kontrole vzrostl na osminásobek, pH v kontrolním vzorku se nezměnilo o více než 1,5 jednotky a pokud zjištěná hodnota 168hIC50 dichromanu draselného je v rozsahu 5,5 až 10 mg/l.

5.4. Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi *V. fischeri*

Pro doplnění baterie testů byl proveden test na zástupci destruentů, bakterii *V. fischeri*. V tomto testu bylo provedeno pouze orientační posouzení toxicity. Byly připraveny roztoky každého sladidla o koncentraci 1 000 mg/l.

Příprava vzorku

Jednotlivá sladidla byla navážena a rozpuštěna v 2% NaCl tak, aby výsledná koncentrace roztoků byla 1 000 mg/l. Navážky byly rozpuštěny v chloridu sodném z toho důvodu, že se jedná o mořské bakterie, a proto je třeba zajistit vhodné životní podmínky.

Pokud jsou testované roztoky silně zakalené, je třeba provést korekci barvy. V opačném případě by mohlo docházet ke ztrátám luminiscence. Hodnota, při které je třeba provést korekci, je 1 800 μE .

Příprava testu a průběh testu

Na test byla použita bakteriální suspenze připravená z komerčně dostupných bakterií. Ty musí být uchovávány v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^\circ\text{C}$ až $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Jakmile jsou bakterie rozmrazené, jsou ihned použitelné k měření.

Pro měření intenzity bioluminiscence před a po přidání testované látky se používá přístroj luminometr LUMISTox 300 s termoblokem. Do termobloku byl vložen rozmrazený reaktivační roztok a připravená ředící voda (2% NaCl). Termoblok je temperován na 15 °C. Do ampulky se zmraženými luminiscenčními bakteriemi bylo napipetováno 500 µl vytemperovaného reaktivačního roztoku a takto připravená ampulka byla 15 minut temperována. Po uplynutí 15 minut byl obsah ampulky přelit ke zbývajícimu reaktivačnímu roztoku a vzniklá zásobní suspenze byla jemným třepáním homogenizována.

Do termobloku byly nachystány skleněné kyvety pro vzorky, kyvety s roztoky pro výpočet korekčního faktoru, kyveta pro kontrolní roztok a kyveta pro referenční látku.

Pro výpočet korekčního faktoru byly připraveny dva roztoky, které obsahovaly 500 µl suspenze bakterií, a byla změřena luminiscence. Ihned po změření bylo ke směsi přidáno 500 µl ředící vody a luminiscence byla měřena po 15 a 30 minutách. Kontrolním roztokem byl 2% NaCl s bakteriální suspenzí, který byl měřen vždy před měřením vzorků. A jako referenční látka byl připraven 7,5% NaCl s bakteriální suspenzí, který byl proměřen po 15 a 30 minutách od počátku inkubace. 7,5% roztok NaCl byl rovněž součástí sady pro testování.

Do skleněných kyvet pro vzorky bylo napipetováno 500 µl bakteriální suspenze a následně 500 µl vzorku. Po uplynutí 15 a 30 minut byla měřena inhibice luminiscence oproti kontrole.

Vyhodnocení testu

Výpočet korekčního faktoru byl proveden dle rovnice (5):

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}, \text{ kde} \quad (5)$$

f_{kt} korekční faktor pro expozici 15 nebo 30 min

I_{kt} intenzita luminiscence kontrolního vzorku po expozici 15 nebo 30 minut v relativních jednotkách luminiscence

I_0 intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředící vody v relativních jednotkách luminiscence

Validita testu

Test je validní, jestliže se při použití 7,5% NaCl jako referenčního roztoku hodnota inhibice luminiscence pohybuje v rozsahu 40 až 60 %. Další podmínkou platnosti testu je hodnota korekčního faktoru, která by se měla po 15 a 30 minutové expozici nacházet v rozmezí hodnot 0,6 až 1,8.

6. VÝSLEDKY EKOTOXIKOLOGICKÉHO POSOUZENÍ

V této kapitole jsou uvedeny výsledky získané testováním jednotlivých umělých sladidel na organismech akvatického ekosystému.

6.1. Alternativní test toxicity Thamnotoxkit FTM na organismu *T. platyurus*

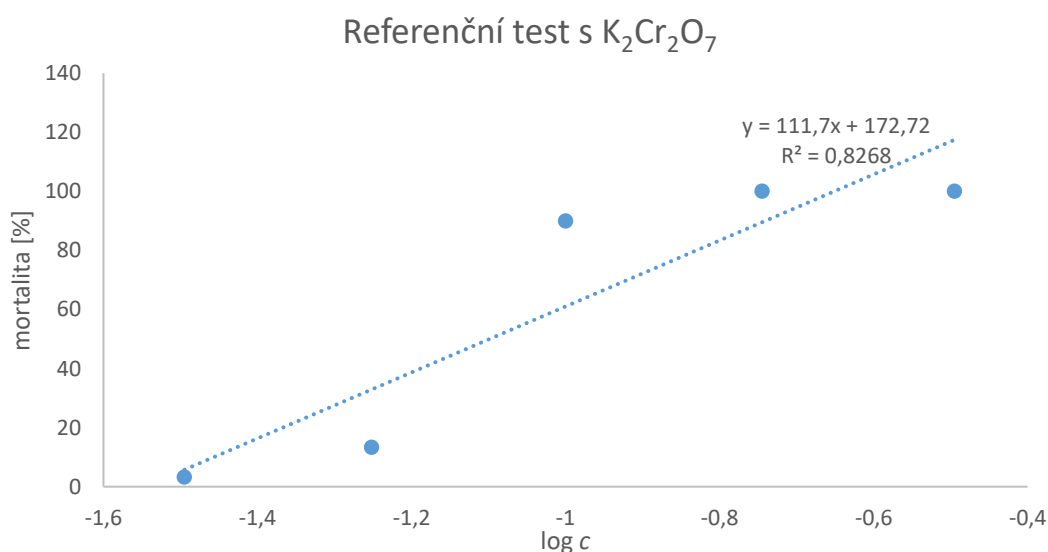
Na organismu *T. platyurus* byla testována následující sladidla: acesulfam-K, cyklamát, sacharin, sukralosa, pro zajímavost a porovnání bylo testováno i přírodní sladidlo lékořice. Test byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.1. Pro všechna sladidla byla zvolena stejná koncentrační řada: 0; 100; 200; 400; 800 a 1 600 mg/l a na základě výsledků bylo zhodnoceno, zda zvolená koncentrační řada bude doplněna, případně upravena, nebo zda postačí k orientačnímu hodnocení ekotoxicity umělých sladidel.

6.1.1. Referenční test s dichromanem draselným K₂Cr₂O₇

Test s referenční látkou se provádí z důvodu hodnocení validity testu. Test je platný, pokud se hodnota 24hLC₅₀ pohybuje v rozmezí hodnot koncentrací od 0,052 do 0,148 mg/l. Počet mrtvých a imobilizovaných jedinců je uveden v tabulce 25. V grafu 8 je uvedena závislost mortality na logaritmickém vyjádření koncentrace.

Tabulka 25: Výsledky referenčního testu

koncentrace	0 mg/l	0,032 mg/l	0,056 mg/l	0,1 mg/l	0,18 mg/l	0,36 mg/l
opakování	0/0/0	0/1/0	2/1/1	8/10/9	10/10/10	10/10/10
průměrná mortalita [%]	0	3,3	13,3	90	100	100



Graf 8: Závislost mortality organismu *T. platyurus* na logaritmickém vyjádření koncentrací

Hodnota $\log c$ byla vypočítána z rovnice lineární regrese grafické závislosti mortality na koncentraci vyjádřené v logaritmických hodnotách. Po odlogaritmování byla hodnota 24hLC50 stanovena na 0,080 mg/l. Pro porovnání byla tato hodnota stanovena i probitovou metodou na 0,06903 mg/l. Obě tyto koncentrace leží v rozmezí hodnot 0,052-0,148 mg/l, což je kritérium, na základě kterého je test platný.

6.1.2. Testování umělých sladidel

Po testování sladidel byly stanoveny hodnoty 24hLC50. Tyto hodnoty nebylo možno určit ve všech případech, z tohoto důvodu, pro lepší porovnání sladidel, byla určena i hodnota 24hLC20. Tyto hodnoty byly stanoveny výpočtem z rovnice lineární regrese závislosti mortality na logaritmech koncentrací a také probitovou metodou. Všechny získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 31.

V následujících tabulkách jsou uvedeny počty uhynulých jedinců při testování jednotlivých sladidel.

Tabulka 26: Testování acesulfamu-K

Acesulfam-K	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/1	1/2/1	2/1/2	3/0/2	2/1/3	6/9/9
	průměrná mortalita [%]	3,3	13,3	16,7	16,7	20	80

Při ekotoxikologickém posouzení acesulfamu-K byla stanovena hodnota 24hLC50 a pro porovnání s ostatními sladidly i hodnota 24hLC20. 24hLC50 byla stanovena na 1 140 mg/l. Hodnota 24hLC20 byla odečtena přímo ze zjištěných mortalit (800 mg/l).

Tabulka 27: Testování cyklamátu

Cyklamát	Předběžný test						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/1/0	0/0/0	0/0/1	0/0/1	0/1/1	3/2/2
	průměrná mortalita [%]	3,3	0	3,3	3,3	6,7	23,3
	Doplnění koncentrační řady						
	koncentrace	0 mg/l	2 000 mg/l	2 400 mg/l			
	opakování	0/0	2/4	4/3			
průměrná mortalita [%]	0	30	35				

Pro ekotoxikologické posouzení cyklamátu byl proveden předběžný test. Při testování nejvyšší koncentrace docházelo pouze k 23,3% úmrtnosti, a proto byla řada rozšířena o další dvě koncentrace – 2 000 mg/l a 2 400 mg/l. Nicméně i při koncentraci 2 400 mg/l došlo pouze k 35% úmrtnosti, proto mohla být stanovena pouze hodnota 24hLC20 na 1 082 mg/l.

Doplněná koncentrační řada byla provedena pouze ve dvou opakováních, z důvodu nedostatku testovacích organismů.

Tabulka 28: Testování sacharinu

Sacharin	Předběžný test						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	3/2/2	4/5/3	7/7/6	10/10/10	10/10/10	10/10/10
	průměrná mortalita [%]	23,3	40	66,7	100	100	100
	Opakování předběžného testu						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	1/0/0	0/1/2	3/4/4	10/10/10	10/10/10	10/10/10
	průměrná mortalita [%]	3,3	10	36,7	100	100	100
	Základní test						
	koncentrace	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	300 mg/l	400 mg/l
	opakování	1/0/0	1/2/1	2/1/2	3/2/2	10/10/10	10/10/10
	průměrná mortalita [%]	3,3	13,3	16,7	23,3	100	100
	Doplnění základního testu						
	koncentrace	0 mg/l	175 mg/l	200 mg/l	225 mg/l	250 mg/l	275 mg/l
	opakování	1/0/0	2/3/2	2/3/3	8/7/6	9/8/10	10/10/10
průměrná mortalita [%]	3,3	23,3	26,7	70	90	100	

První předběžný test musel být opakován, protože úmrtnost v kontrole byla vyšší než 10 %, což je podmínka platnosti testu. Z výsledků předběžného testu byla zvolena koncentrační řada pro základní test, ze kterého poté mohla být stanovena 24hLC50 na 208,7 mg/l. Pro porovnání s ostatními sladidly byla opět stanovena i hodnota 24hLC20 na 115,0 mg/l.

Tabulka 29: Testování sukralosy

Sukralosa	Předběžný test						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	2/2/3	2/1/3	2/1/2	2/1/2	4/1/4	4/2/4
	průměrná mortalita [%]	23,3	20	16,7	16,7	30	33,3
	Opakování předběžného testu						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/1/0	1/0/0	1/1/0	0/1/2	1/1/1	4/2/1
	průměrná mortalita [%]	3,3	3,3	6,7	10	10	23,3
	Doplnění koncentrační řady						
	koncentrace	0 mg/l	2 400 mg/l	3 200 mg/l			
	opakování	1/0/1	2/4/4	3/5/4			
	průměrná mortalita [%]	6,7	33,3	40			

Vzhledem k tomu, že úmrtnost v kontrole byla v prvním předběžném testu vyšší než 10 %, test nebyl platný a musel být opakován. V nejvyšší testované koncentraci došlo pouze k 23,3% úmrtnosti, proto byla koncentrační řada doplněna o další dva body – koncentrace 2 400 mg/l a 3 200 mg/l. Ani v tomto případě nedošlo k 50% úmrtnosti, a proto hodnota LC50 nemohla být stanovena. Nicméně, rozšířená koncentrační řada posloužila k přesnějšímu výpočtu 24hLC20 (840,8 mg/l).

Tabulka 30: Testování lékořice

Lékořice	Předběžný test						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	1/0/0	0/0/0	1/1/0	2/3/4	10/10/10	10/10/10
	průměrná mortalita [%]	3,3	0	6,7	30	100	100
	Základní test						
	koncentrace	0 mg/l	300 mg/l	400 mg/l	500 mg/l	600 mg/l	700 mg/l
	opakování	1/0/0	6/5/5	7/8/4	8/9/10	10/10/10	10/10/10
	průměrná mortalita [%]	3,3	53,3	63,3	90	100	100

Po provedení předběžného testu byla koncentrační řada upravena a byl proveden základní test. Hodnota 24hLC50 byla 288,5 mg/l. Opět měla být pro porovnání s ostatními sladidly stanovena také 24hLC20, nicméně, jak vyplývá z naměřených dat, test by musel být opakován z důvodu

velké rozdílnosti výsledků předběžného a základního testu. Pro posouzení účinků jednotlivých sladidel byla stanovena 24hLC20 z předběžného testu na hodnotu 209,6 mg/l.

6.1.3. Shrnutí výsledků

V tabulce 31 jsou shrnuty výsledky testování umělých sladidel a sladidla lékořice na organismech *T. platyurus*.

Tabulka 31: Shrnutí výsledků testování sladidel na *T. platyurus*

c [mg/l]	24hLC20		24hLC50	
	závislost mortality (%) na log c	závislost mortality (probity) na log c	závislost mortality (%) na log c	závislost mortality (probity) na log c
acesulfam-K	800 ¹⁾	800 ¹⁾	1 140	1 142
cyklamát	1 082	1 402	- ²⁾	- ²⁾
sacharin	115,0	121,0	208,7	206,7
sukralosa	840,8	1 109	- ²⁾	- ²⁾
lékořice	209,6	242,1	288,5	325,1

¹⁾ hodnota je odečtena přímo ze získaných mortalit

²⁾ nelze stanovit pro nedostatek údajů

6.2. Alternativní test toxicity Daphnotoxkit FTM na organismu *D. magna*

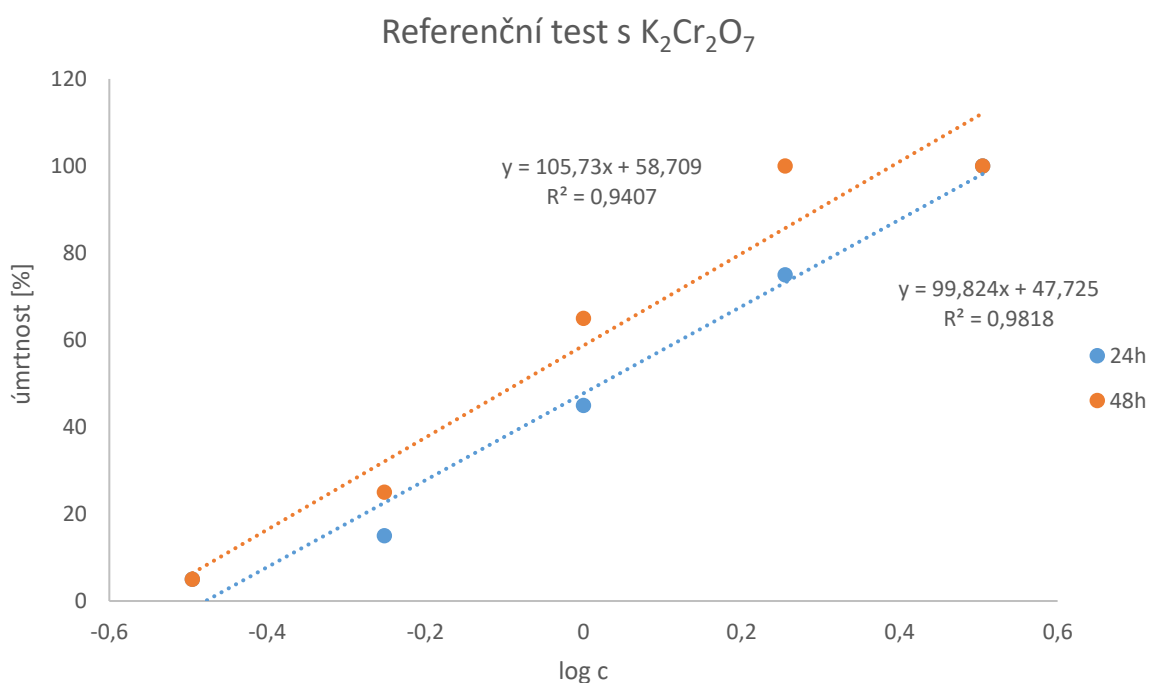
Alternativní test na organismu *D. magna* byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.2. Pro všechna testovaná sladidla byla zvolena stejná koncentrační řada: 0; 100; 200; 400; 800; 1 600 mg/l. Na základě výsledků předběžného testu bylo rozhodnuto, zda bude proveden i test základní nebo zda bude daná koncentrační řada pouze doplněna.

6.2.1. Referenční test s dichromanem draselným K₂Cr₂O₇

Pro ověření platnosti testu byl proveden referenční test s dichromanem draselným, jehož výsledky jsou uvedeny v tabulce 32. Platnost testu vyplývá z ČSN EN ISO 6341, kde je uvedené, že test je platný, pokud se hodnota 24hEC50 pohybuje mezi 0,6-2,1 mg/l. Hodnota deklarovaná výrobcem byla 1,32 mg/l (24hEC50) a 0,84 mg/l (48hEC50). Závislost mortality na logaritmičtém vyjádření koncentrace je zobrazena v grafu 9.

Tabulka 32: Výsledky referenčního testu

24 hodin						
koncentrace	0 mg/l	0,32 mg/l	0,56 mg/l	1 mg/l	1,8 mg/l	3,2 mg/l
opakování	0/0/0/0	0/0/1/0	0/0/2/1	3/2/2/2	4/4/4/3	5/5/5/5
průměrná mortalita [%]	0	5	15	45	75	100
48 hodin						
koncentrace	0 mg/l	0,32 mg/l	0,56 mg/l	1 mg/l	1,8 mg/l	3,2 mg/l
opakování	0/0/0/0	0/0/1/0	1/1/2/1	4/4/3/2	5/5/5/5	5/5/5/5
průměrná mortalita [%]	0	5	25	65	100	100



Graf 9: Závislost mortality organismu *D. magna* na logaritmickeém vyjádření koncentrací po 24 a 48 hodinách

Z rovnice lineární regrese byla vypočtena hodnota 24hEC50, respektive 48hEC50 na 1,054 mg/l a 0,8272 mg/l. Tyto hodnoty se nachází ve stanoveném rozmezí daném ISO normou, proto je test platný.

6.2.2. Testování umělých sladidel

Pro všechna sladidla byl proveden předběžný test s následující koncentrační řadou: 0; 100; 200; 400; 800; 1 600 mg/l. Pro přesnější určení hodnot 24hEC50 a 48hEC50 byla zvolená koncentrační řada doplněna, ale i přesto u některých sladidel nemohly být hodnoty EC50 na tomto organismu stanoveny. Pro vzájemné porovnání efektů testovaných látek na organismu *D. magna* byly vypočteny tedy i hodnoty EC20. Tyto hodnoty byly vypočteny z rovnice lineární

regrese závislosti mortality vyjádřené v procentech na logaritmičtém vyjádření koncentrací. Pouze pro srovnání byly stanoveny také probitovou metodou, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 38.

V následujících tabulkách jsou uvedeny počty uhynulých a imobilizovaných jedinců při testování jednotlivých sladidel.

Tabulka 33: Testování acesulfamu-K

Acesulfam-K	Předběžný test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	4/4/3/4
	průměrná mortalita [%]	0	0	0	0	5	75
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	1/0/1/0	1/0/1/0	5/5/5/5
	průměrná mortalita [%]	0	0	5	10	10	100
	Doplnění předběžného testu						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	1 000 mg/l	1 200 mg/l	1 400 mg/l		
	opakování	0/0/0/0	0/1/1/0	0/1/1/0	2/1/2/2		
	průměrná mortalita [%]	0	10	10	30		
	48 hodin						
koncentrace	0 mg/l	1 000 mg/l	1 200 mg/l	1 400 mg/l			
opakování	0/0/0/0	1/1/1/1	1/1/3/2	3/4/3/2			
průměrná mortalita [%]	0	20	35	60			

Při testování acesulfamu-K byly v předběžném testu zjištěny hodnoty mortality, které by nestačily na výpočet EC50 ani EC20, a proto byl test doplněn o další testované koncentrace tak, aby pokud možno mohly být dané hodnoty stanoveny. Hodnota 24hEC20 byla vypočtena na 1 213 mg/l a hodnota 24EC50 byla stanovena pouze orientačně – 1 515 mg/l. K přesnějšímu určení by bylo třeba provést další test, při kterém by byla získána alespoň ještě jedna koncentrace, při níž by docházelo k úmrtnosti vyšší než 50 %. Koncentrace, při níž dochází k 20% imobilizaci či mortalitě po 48 hodinách (48hLC20), byla stanovena na 1 000 mg/l a v případě 50% imobilizaci nebo mortality (48hLC50) na 1 346 mg/l.

Tabulka 34: Testování cyklamátu

Cyklamát	Předběžný test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/1/0	3/1/4/3
	průměrná mortalita [%]	0	0	0	0	10	55
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/1/0	2/1/1/1	4/4/3/4
	průměrná mortalita [%]	0	0	0	5	25	75
	Doplnění předběžného testu						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	600 mg/l	1 200 mg/l	2 000 mg/l		
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	1/2/0/1	5/2/4/3		
	průměrná mortalita [%]	0	0	20	70		
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	600 mg/l	1 200 mg/l	2 000 mg/l		
opakování	0/0/0/0	1/0/2/0	2/3/1/2	4/4/4/4			
průměrná mortalita [%]	0	15	35	80			

I při testování cyklamátu byla původní koncentrační řada rozšířena o další hodnoty k získání přesnějších EC20 a EC50. 24hEC20 byla zjištěna přímo z naměřených údajů, kdy 20% imobilizace odpovídá koncentraci 1 200 mg/l. 24hEC50 byla stanovena výpočtem na 1 559 mg/l. Po uplynutí 48 hodin byl opět odečten počet imobilizovaných a uhynulých organismů a byly stanoveny hodnoty 48hLC20 (633,7 mg/l) a 48hLC50 (1 271 mg/l).

Tabulka 35: Testování sacharinu

Sacharin	Předběžný test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	2/2/1/3	5/5/5/5	5/5/5/5	5/5/5/5
	průměrná mortalita [%]	0	0	40	100	100	100
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/1/0/0	0/1/0/0	4/3/4/4	5/5/5/5	5/5/5/5	5/5/5/5
	průměrná mortalita [%]	5	5	75	100	100	100
	Základní test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	130 mg/l	160 mg/l	190 mg/l	220 mg/l	
	opakování	0/0/0/0	0/1/0/0	1/1/1/1	3/1/3/0	5/4/4/4	
	průměrná mortalita [%]	0	5	20	35	80	
	48 hodin						
koncentrace	0 mg/l	130 mg/l	160 mg/l	190 mg/l	220 mg/l		
opakování	0/0/0/0	1/0/0/1	2/1/1/1	3/4/3/3	4/4/5/5		
průměrná mortalita [%]	0	10	25	65	90		

Po 24 hodinách docházelo při koncentraci 200 mg/l již k 40% imobilizaci, proto byla koncentrační řada doplněna. Na základě upravené koncentrační řady poté bylo možné stanovit 24hEC20 na 160 mg/l, což vyplývá přímo z tabulky, dále 24hEC50 na 207,6 mg/l. EC20 a EC50 byly stanoveny i po 48 hodinách – 48hEC20 na 131,2 mg/l a 48hEC50 na 177,0 mg/l.

Tabulka 36: Testování sukralosy

Sukralosa	Předběžný test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	1/1/1/1
	průměrná mortalita [%]	0	0	0	0	0	20
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/1/0	0/0/1/1	0/1/2/1	1/2/1/1
	průměrná mortalita [%]	0	0	5	10	20	25

Přestože z naměřených dat nelze získat spolehlivé výsledky, nebyla koncentrační řada dále upravována vzhledem k předchozím testům, ve kterých byla zjištěna nízká toxicita sukralosy. Pro porovnání s ostatními sladidly byly orientačně stanoveny odečtem z tabulky pouze hodnoty 24hEC20 (1 600 mg/l) a 48hEC20 (800 mg/l).

Tabulka 37: Testování lékořice

Lékořice	Předběžný test						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/1/0	3/4/3/3	5/5/5/5	5/5/5/5
	průměrná mortalita [%]	0	0	10	65	100	100
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	100 mg/l	200 mg/l	400 mg/l	800 mg/l	1 600 mg/l
	opakování	0/0/0/0	0/1/0/0	2/1/1/2	5/4/4/5	5/5/5/5	5/5/5/5
	průměrná mortalita [%]	0	5	30	90	100	100
	Doplnění předběžného testu						
	24 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	150 mg/l	250 mg/l	300 mg/l	350 mg/l	
	opakování	0/0/0/0	1/0/0/0	1/1/1/0	1/2/1/1	1/2/2/2	
	průměrná mortalita [%]	0	5	15	25	35	
	48 hodin						
	koncentrace	0 mg/l	150 mg/l	250 mg/l	300 mg/l	350 mg/l	
opakování	0/0/0/0	1/0/2/1	1/2/2/2	2/3/3/3	4/3/3/4		
průměrná mortalita [%]	0	20	35	55	70		

Podobně jako u sacharinu docházelo k úmrtnosti a imobilizaci jedinců při nižších koncentracích, a proto byla koncentrační řada doplněna, díky čemuž se podařilo získat hodnoty 24hEC20 (250,4 mg/l), 24hEC50 (382,0 mg/l), 48hEC20 (149,5 mg/l) a 48hEC50 (254,5 mg/l).

6.2.3. Shrnutí výsledků

Výsledky testování sladidel na organismu *D. magna* jsou shrnuty v tabulce 38. Pouze pro porovnání jsou uvedeny i výsledky stanovené také probitovou metodou.

Tabulka 38: Shrnutí výsledků testování sladidel na *D.magna*

c [mg/l]	24hEC50		48hEC50	
sladidlo	závislost mortality (%) na log <i>c</i>	závislost mortality (probity) na log <i>c</i>	závislost mortality (%) na log <i>c</i>	závislost mortality (probity) na log <i>c</i>
acesulfam-K	1 515	1 501	1 346	- ¹⁾
cyklamát	1 559	1 583	1 271	1 206
sacharin	207,6	183,4	177,0	167,2
sukralosa	- ¹⁾	- ¹⁾	- ¹⁾	- ¹⁾
lékořice	382,0	393,8	254,5	254,4
c [mg/l]	24hEC20		48hEC20	
sladidlo	závislost mortality (%) na log <i>c</i>	závislost mortality (probity) na log <i>c</i>	závislost mortality (%) na log <i>c</i>	závislost mortality (probity) na log <i>c</i>
acesulfam-K	1 213	1 246	1 000 ²⁾	1 000
cyklamát	1 200 ²⁾	1 200	633,7	701,7
sacharin	160,0 ²⁾	160,0	131,2	139,2
sukralosa	1 600 ²⁾	1 600 ²⁾	800 ²⁾	800 ²⁾
lékořice	250,4	251,4	149,5	162,1

¹⁾ nelze stanovit pro nedostatek hodnot

²⁾ hodnota je odečtena přímo z tabulky

6.3. Test inhibice růstu okřehku menšího (*L. minor*)

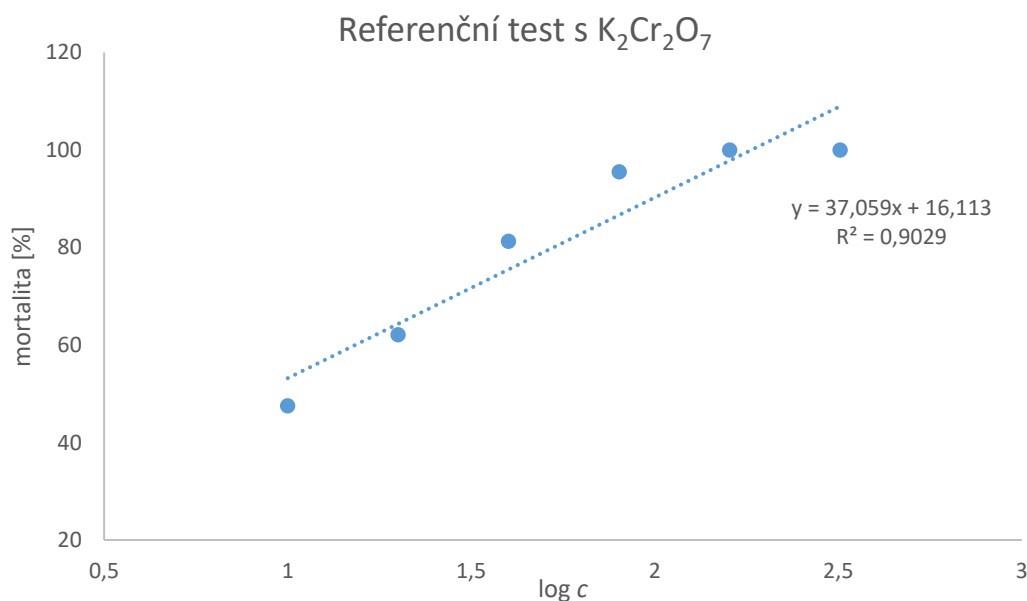
Test na okřehku menším byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 5.3. Testování probíhalo na sladidlech acesulfamu-K, sacharinu, sukralose a lékořici. Testování cyklamátu bylo vynecháno z důvodu spotřeby velkého množství standardu, kterého bylo k dispozici v omezeném množství. Pro všechna sladidla byla v předběžném testu zvolena následující koncentrační řada: 0; 100; 300; 900; 1 800 mg/l.

6.3.1. Referenční test s dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$

Pro posouzení platnosti testu se provádí test se standardní látkou dichromanem draselným. Test je považován za platný, pokud se hodnota $168hIC_{50}$ pohybuje v rozsahu 5,5 až 10 mg/l. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 39 a závislost inhibice na logaritmu koncentrací zobrazuje graf 10.

Tabulka 39: Výsledky referenčního testu

koncentrace [mg/l]	počet lístků	μ	I_{μ} [%]
0	95	0,4599	
10	27	0,2144	53,38
20	22	0,1744	62,07
40	14	0,08623	81,25
80	10	0,02056	95,53
160	9	0	100
320	9	0	100



Graf 10: Závislost inhibice růstu na logaritmickém vyjádření koncentrací

Z rovnice lineární regrese byla hodnota 168hIC50 stanovena na 6,575 mg/l. Tato zjištěná hodnota se nachází v rozmezí limitu, který určuje validitu testu, a proto může být test považován za platný.

6.3.2. Testování umělých sladidel

V této kapitole jsou uvedeny výsledky testování sladidel a stanoveny hodnoty 168IC520 a 168IC50, které byly vypočítány ze vztahů uvedených v kapitole 5.3. Shrnutí výsledků je v tabulce 44.

Tabulka 40: Testování acesulfamu-K

Acesulfam-K	koncentrace [mg/l]	počet lístků 1. série	počet lístků 2. série	μ 1. série	μ 2. série	μ průměr	I_μ [%]
	0	73	75	0,01246	0,01262	0,01254	
	100	100	67	0,01433	0,01099	0,01266	-0,96
	300	127	48	0,01576	0,00996	0,01286	-2,55
	900	109	102	0,01485	0,01445	0,01465	-16,81
	1 800	67	54	0,01195	0,01067	0,01131	9,83

Pro umělé sladidlo acesulfam-K nemohla být na základě testování stanovena hodnota 168hIC50 ani 168hIC20, protože k inhibici růstu okřehku docházelo až při testování nejvyšší koncentrace 1 800 mg/l. Ve zbylých koncentracích docházelo ke stimulaci růstu.

Tabulka 41: Testování sacharinu

Sacharin	Předběžný test			Základní test						
	koncentrace [mg/l]	počet lístků 1. série	počet lístků 2. série	koncentrace [mg/l]	počet lístků 1. série	počet lístků 2. série	μ 1. série	μ 2. série	μ průměr	I_μ [%]
	0	101	92	0	85	95	0,4382	0,4599	0,4491	
	100	9	9	20	71	68	0,4031	0,3947	0,3989	11,18
	300	9	9	40	48	61	0,3267	0,3735	0,3501	22,04
	900	9	9	60	17	22	0,1241	0,1744	0,1493	66,76
	1 800	9	9	80	14	9	0,08623	0	0,04311	90,40
			100	9	9	0	0	0	100	

Na základě předběžného testu, ve kterém docházelo již v koncentraci 100 mg/l k 100% inhibici růstu, byl proveden základní test s upravenou koncentrační řadou. Z rovnice lineární regrese byla stanovena hodnota 168IC20 27,47 mg/l. Hodnota 168hIC50 byla vypočtena na 45,53 mg/l. Během testování byla pozorována nekróza lístků (od koncentrace 60 mg/l), která rostla úměrně se zvyšující se koncentrací.

Tabulka 42: Testování sukralosy

Sukralosa	koncentrace	počet lístků	počet lístků	μ	μ	μ	I_{μ}
	[mg/l]	1. série	2. série	1. série	2. série	průměr	[%]
	0	85	128	0,01337	0,01580	0,01458	
	100	84	102	0,01330	0,01445	0,01387	5,13
	300	86	116	0,01344	0,01571	0,01522	1,80
	900	96	113	0,01371	0,01506	0,01438	1,40
	1 800	71	95	0,01229	0,01403	0,01316	10,81

Při testování sukralosy docházelo k nízké inhibici růstu okřehku – u nejvyšší testované koncentrace byla tato inhibice pouze 10,81 %, a proto nemůže být stanovena hodnota 168hIC50 ani 168hIC20.

Tabulka 43: Testování lékořice

Lékořice	koncentrace	počet lístků	počet lístků	μ	μ	μ	I_{μ}
	[mg/l]	1. série	2. série	1. série	2. série	průměr	[%]
	0	76	106	0,01270	0,01468	0,01369	
	100	36	44	0,009446	0,01088	0,01016	25,75
	300	39	32	0,008728	0,007551	0,008139	40,54
	900	35	26	0,004448	0,006315	0,005381	60,69
	1 800	9	11	0	0,001194	0,005972	95,64

Hodnota 168hIC20 byla vypočtena na 98,40 mg/l, ovšem pro její přesnější učení by bylo třeba provést další test, aby byly získány koncentrace způsobující inhibici růstu menší než 20 %. Stejně jako u sacharinu byla stanovena i hodnota 168hIC50 na 366,4 mg/l. I v tomto případě docházelo s rostoucí koncentrací ke zvyšující se nekróze lístků, která byla pozorována od koncentrace 300 mg/l.

6.3.3. Shrnutí výsledků

Tabulka 44: Shrnutí výsledků testování sladidel na *L. minor*

sladidlo	168hIC20	168hIC50
acesulfam-K	- ¹⁾	- ¹⁾
sacharin	27,47 mg/l	45,53 mg/l
sukralosa	- ¹⁾	- ¹⁾
lékořice	98,40 mg/l	366,4 mg/l

¹⁾ hodnoty nemohly být stanoveny, protože docházelo ke stimulaci nebo k malé inhibici růstu

6.4. Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi bakterie *V. fischeri*

V tomto testu byl proveden screening všech sladidel na bakterii *V. fischeri*, který slouží pro vzájemné porovnání toxicity sladidel. Byla zvolena koncentrace 1 000 mg/l.

Prvním krokem bylo změření zákalu vzorků pro případnou korekci barvy, která by musela být provedena, pokud by některá hodnota dosahovala 1,8 E.

Naměřené hodnoty vzorků:

- ACE – 0,012 E
- CYC – 0,000 E
- SAC – 0,005 E
- SUC – 0,008 E
- LÉK – 0,071 E

Žádná testovaná látka nepřesáhla hodnotu 1,8 E, proto mohlo být přistoupeno k testování. Test byl proveden celkem třikrát, přičemž ani jednou nemohl být považován za platný, protože nesplnil podmínky validity. Testování neprobíhalo pouze s jednou šarží bakterií, ale byly vyzkoušeny i jiné šarže z důvodu vyloučení chyby v dodané sadě. V tabulce 45 a 46 jsou zobrazeny hodnoty inhibice referenčního testu (7,5% NaCl) a hodnoty korekčních faktorů počítané z inhibice luminiscence bakteriálních suspenzí (BS).

Tabulka 45: Inhibice luminiscence – referenční test

test	I ₁₅ [%]	I ₃₀ [%]
test 1	98,08	97,00
test 2	4,72	9,71
test 3	71,75	72,42

Vzhledem k tomu, že inhibice luminiscence se po 30 minutách nepohybovala v rozmezí hodnot 40-60 %, test nemůže být považován za platný.

Tabulka 46: Vypočítané hodnoty korekčních faktorů

test	vzorek	I ₀ [%]	I ₁₅ [%]	I ₃₀ [%]	f _{k15}	průměr	f _{k30}	průměr
test 1	BS1	261,9	191,5	207,7	0,7312	0,7930	0,7931	0,8637
	BS2	219,1	187,3	204,7	0,8549		0,9343	
test 2	BS1	367,5	344,8	430,1	0,9382	0,9817	1,170	1,195
	BS2	326,9	335,1	398,9	1,025		1,220	
test 3	BS1	705,4	590,1	576,0	0,8365	0,8972	0,8166	0,8781
	BS2	611,5	585,7	574,6	0,9578		0,9397	

Hodnoty korekčních faktorů splňují podmínku platnosti testu, podle které se korekční faktory musí pohybovat v rozmezí hodnot 0,6-1,8.

Naměřené hodnoty inhibice a stimulace luminiscence bakterií po expozici sladidel jsou uvedeny v tabulce 47.

Tabulka 47: Naměřené hodnoty inhibice/stimulace luminiscence

sladidlo	test 1		test 2		test 3	
	I ₁₅ [%]	I ₃₀ [%]	I ₁₅ [%]	I ₃₀ [%]	I ₁₅ [%]	I ₃₀ [%]
ACE	-1,86	-3,5	3,64	2,96	1,78	-0,07
CYC	3,64	9,90	5,40	4,04	5,89	1,88
SAC	28,73	27,57	23,67	22,99	7,68	5,31
SUC	4,64	8,96	-2,92	-1,54	3,34	-0,59
LÉK	5,90	11,46	-1,59	-2,97	7,10	3,47

I když provedené testy nejsou platné, z naměřených výsledků lze vyzorovat určitý trend, a to že i v tomto případě vykazovala sladidla sacharin následovaný lékořicí nejvyšší toxicitu. Vzhledem k vzájemně odlišným hodnotám v provedených testech nelze data více komentovat. Pro objektivitu a korektnost výsledků budou testy na tomto organismu v budoucnu opakovány.

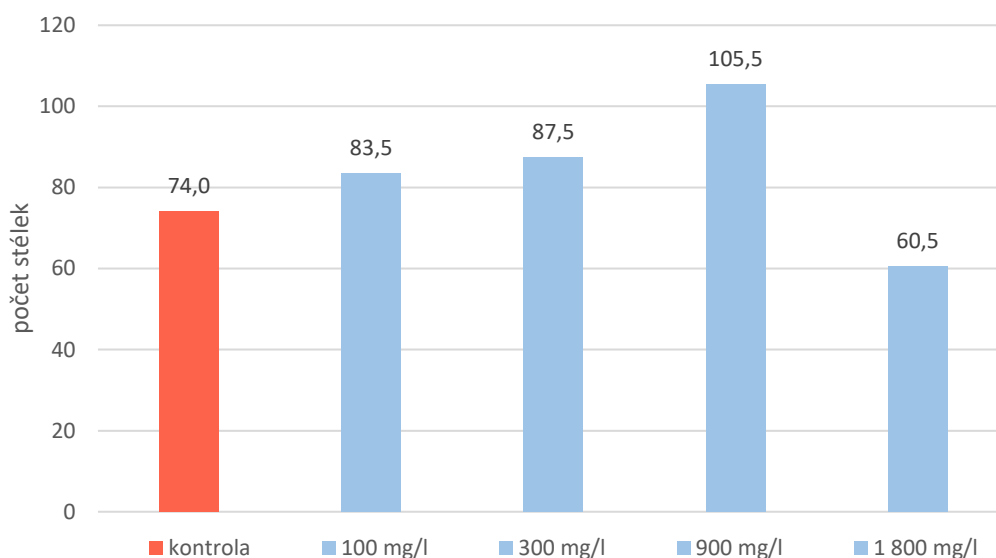
7. DISKUZE VÝSLEDKŮ EKOTOXIKOLOGICKÉHO POSOUZENÍ

V této diplomové práci byly provedeny ekotoxikologické testy na sladidlech acesulfam-K, cyklamát, sacharin, sukralosa a lékořice. Přírodní sladidlo lékořice bylo testováno pro zajímavost a možnost porovnání s ostatními umělými sladidly. Na základě ekotoxikologických testů bylo provedeno orientační posouzení ekotoxicity všech sladidel na organismech *T. platyurus*, *D. magna* a *L. minor*. K testům byl proveden i referenční test s dichromanem draselným, na základě jehož výsledků se určuje validita prováděných ekotoxikologických testů. Pro doplnění baterie testů byl také proveden test na bakterii *V. fisheri*.

Jelikož některá sladidla způsobovala při testování vyšších koncentrací pouze nízkou úmrtnost, byly stanoveny mimo LC, EC a IC₅₀ také hodnoty LC, EC a IC₂₀ pro vzájemné porovnání všech sladidel. Ovšem, v některých případech nemohly být stanoveny hodnoty EC₂₀ a IC₂₀.

Jedná se o testování sukralosy na organismu *D. magna*, kde po 24 hodinách docházelo v nevyšší testované koncentraci 1 600 mg/l k 20% úmrtnosti a po 48 hodinách byla úmrtnost 25 %. Z tohoto důvodu a pro účely vzájemného porovnání účinků všech sladidel byly ve výsledcích pouze odečteny hodnoty koncentrací, které vyvolávaly 20% úmrtnost, aniž by byla hodnota EC20 počítána. Pro přesnější určení hodnoty EC20, tzn. výpočtem, by bylo potřeba provést další test s vyššími koncentracemi, abychom získali dostatečné množství parciálních mortalit nad i pod touto inhibicí. Zvyšování testované koncentrace by však nebylo ekologicky relevantní vzhledem ke koncentracím vyskytujícím se v životním prostředí.

Druhým případem bylo testování acesulfamu-K a sukralosy na vodní rostlině *L. minor*, při kterém docházelo dokonce ke stimulaci růstu (acesulfam-K) nebo pouze k malé inhibici (sukralosa) oproti kontrolnímu vzorku. Tento jev může souviset s efektem hormeze, která bývá při hodnocení účinku toxických látek na testovací organismy často popisována. Hormeze spočívá ve stimulaci obranných mechanismů testovacích organismů při působení nízkých dávek toxické látky. V případě acesulfamu-K tedy není v nižších koncentracích pozorována inhibice, ale stimulace oproti kontrole. Danou situaci ilustruje graf 11, ve kterém je zobrazena závislost počtu stélek v jednotlivých koncentracích roztoku acesulfamu-K oproti kontrolnímu vzorku. V grafu 11 lze vidět, že až do koncentrace 900 mg/l docházelo k mírné stimulaci růstu rostliny.



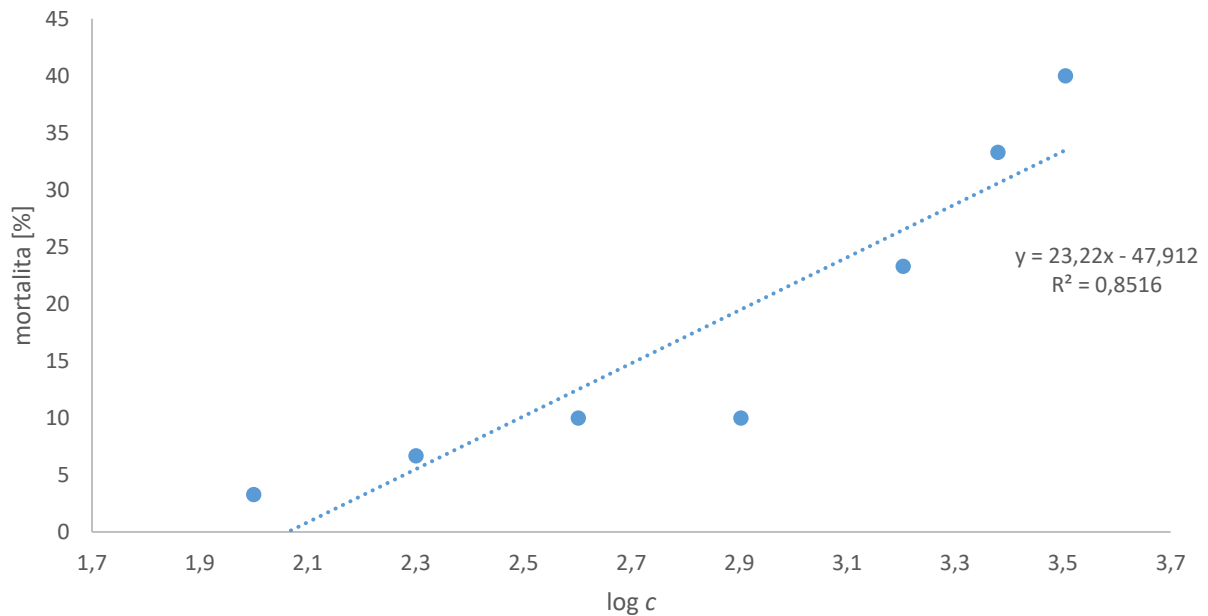
Graf 11: Možný efekt hormeze – acesulfam-K

- **Výpočet LC/EC20 a LC/EC50 pro vodní organismy**

Hodnoty LC/EC20 a LC/EC50 pro vodní organismy byly stanovovány dvojím způsobem, protože odpověď organismů na testovanou látku nepředstavovala vždy lineární odezvu. Prvním způsobem bylo počítání z rovnice lineární regrese závislosti mortality vyjádřené v procentech na logaritmech koncentrací. Druhým způsobem bylo počítání pomocí probitové metody. Nevýhodou klasického způsobu výpočtu je, že dostatečně nekopíruje úmrtnostní křivku. Tuto odchylku se snaží napravit probitová analýza, která spočívá v převedení úmrtnosti na probity.

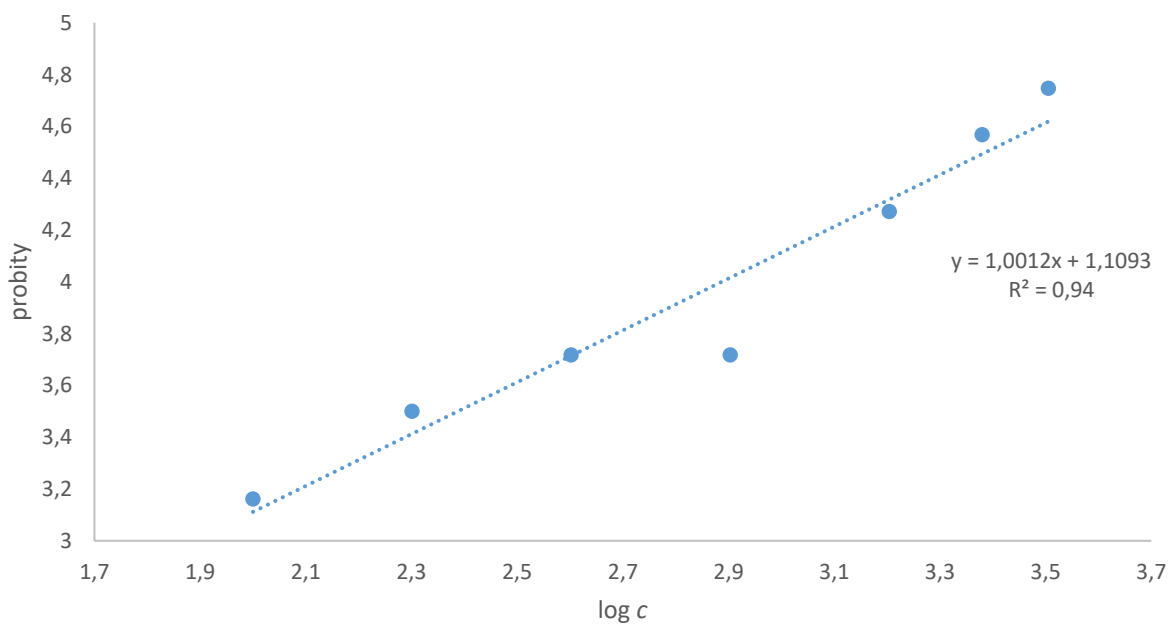
Ty by poté měly vykazovat větší linearitu v závislosti na logaritmech koncentrací, což dokazují i grafy níže. Graf 12 představuje závislost mortality vyjádřené v procentech na logaritmech koncentrací a graf 13 představuje závislost probitů na logaritmech koncentrací. Nicméně počítání pomocí probitů je již zastaralejší metoda, v dnešní době se častěji využívají modernější statistické metody.

Testování sukralosy na *T. platyurus* - klasická metoda výpočtu



Graf 12: Závislost mortality vyjádřené v procentech na logaritmech koncentrací

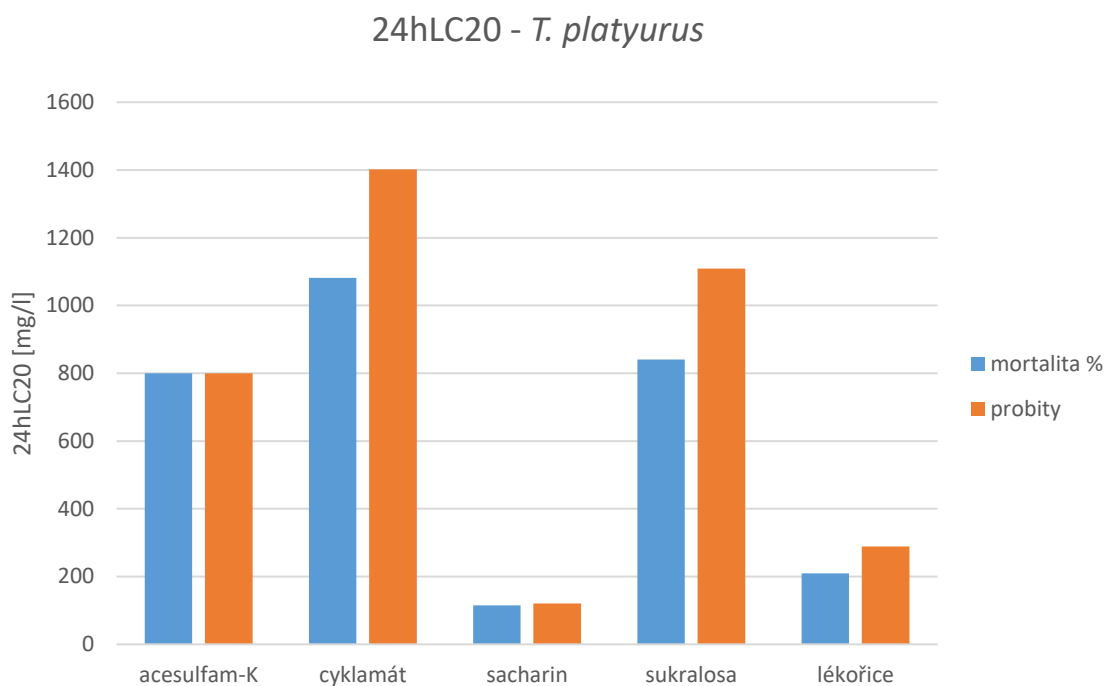
Testování sukralosy na *T. platyurus* - probitová metoda



Graf 13: Závislost probitů na logaritmech koncentrací

- **Thamnotoxkit FTM**

Prvním testovacím organismem byl vodní korýš *T. platyurus*. Ekotoxicita sladidel je zobrazena v grafu 14, přičemž porovnávanou hodnotou je 24hLC20. V grafu 14 je též znázorněno porovnání výpočtu klasickou a probitovou metodou.



Graf 14: Porovnání hodnot 24hLC20 pro organismus *T. platyurus*

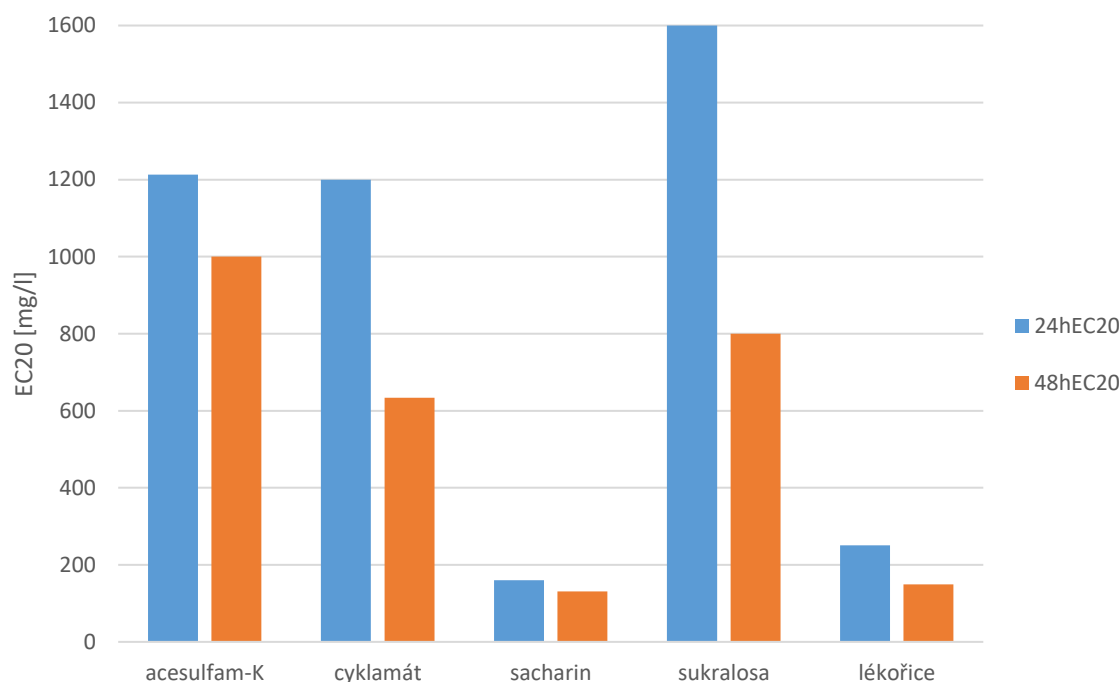
Porovnání hodnot LC50 by nebylo možné provést pro všechna sladidla, protože v některých případech byla úmrtnost nebo imobilizace testovacích jedinců v nejvyšších testovaných koncentracích tak nízká, že tato hodnota nemohla být stanovena. To se týká sladidel cyklamátu a sukralosy, u kterých docházelo k 35% úmrtnosti při koncentraci 2 400 mg/l, respektive 40% úmrtnosti při koncentraci 3 200 mg/l. Doplnovat koncentrační řadu o další hodnoty nebylo smysluplné, protože se tato diplomová práce zabývá orientačním posouzením toxicity pro ekosystém, ve kterém se v této době tak vysoké koncentrace sladidel nevyskytují.

Z grafu 14 vyplývá, že největší ekotoxikologický účinek představují sladidla sacharin a lékořice (24hLC20 je 115,0 mg/l pro sacharin a 174,8 mg/l pro lékořici), které mají významně nižší hodnoty 24hLC20 v porovnání s ostatními sladidly. Nejméně toxické bylo sladidlo cyklamát, pro které byla vypočtena hodnota 24hLC20 na 1 082 mg/l.

Z grafu 14 lze také vidět, že probitovou metodou výpočtu jsou hodnoty 24hLC20 pro všechna sladidla vyšší. Netýká se to acesulfamu-K, u kterého byla tato hodnota stanovena odečtem z tabulky.

- **Daphtoxkit FTM**

Porovnání výsledků testování sladidel na organismu *D. magna* jsou uvedeny v grafu 15. Opět jsou porovnávány hodnoty 24hEC20 a 48hEC20, protože pro sukralosu, vzhledem k nízké úmrtnosti dafnií, nemohla být hodnota 24EC50 a 48hEC50 stanovena. Hodnoty 24hEC20 a 48hEC20 pro sukralosu nejsou vypočteny z rovnice lineární regrese křivky dávka-odpověď opět z důvodu nízké úmrtnosti, ale pro porovnání s ostatními sladidly jsou tyto hodnoty získány přímo z odečtených mortalit. V grafu jsou zobrazeny hodnoty EC20, které byly vypočítány ze závislosti mortality vyjádřené v procentech na log c.

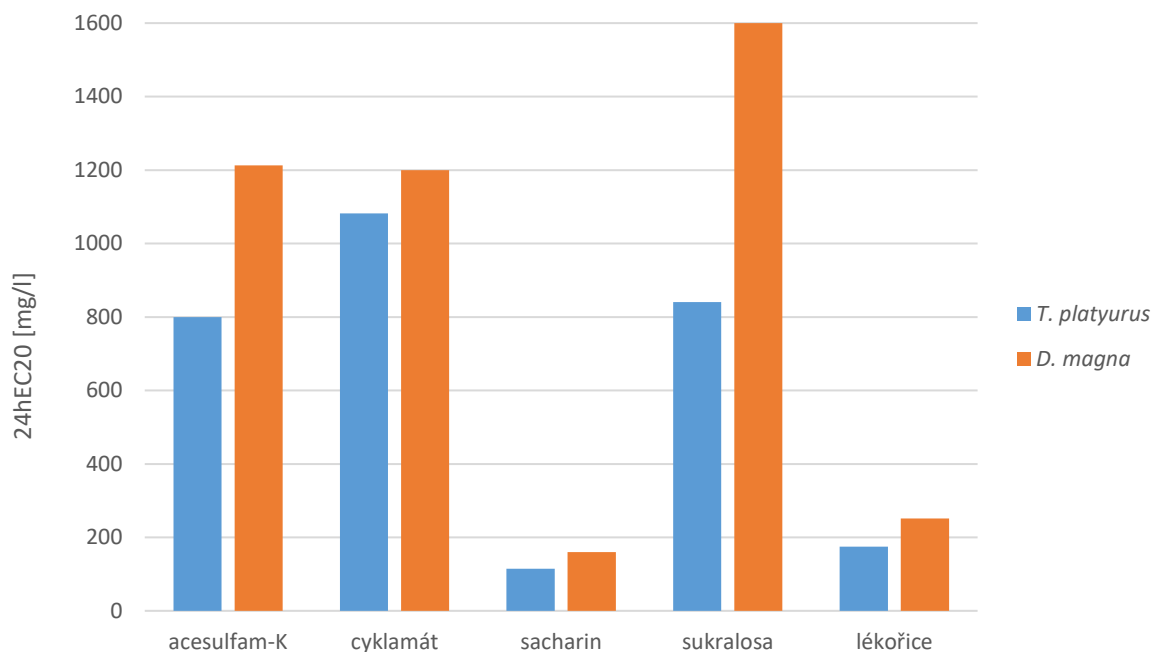


Graf 15: Porovnání hodnot 24hEC20 a 48hEC20 na organismu *D. magna*

Nejvyšší toxicitu opět vykazovala sladidla sacharin a lékořice. Pro sacharin byly hodnoty 24hEC20 a 48hEC20 stanoveny na 160,0 mg/l a 131,2 mg/l. Pro lékořici byly tyto hodnoty mírně vyšší, nicméně v porovnání s ostatními sladidly představují sacharin a lékořice výrazně vyšší toxicitu než ostatní sladidla. Z grafu lze vyzorovat, že hodnota EC20 po 48 hodinách je ve všech případech nižší. Tento efekt naznačuje, že po delší expozici sladidel se může zvyšovat také jejich toxicita.

- **Porovnání citlivosti *T. platyurus* a *D. magna***

Jelikož testovacími organismy byli zástupci vodních korýšů, v grafu 16 je porovnána i citlivost organismů *T. platyurus* a *D. magna*.

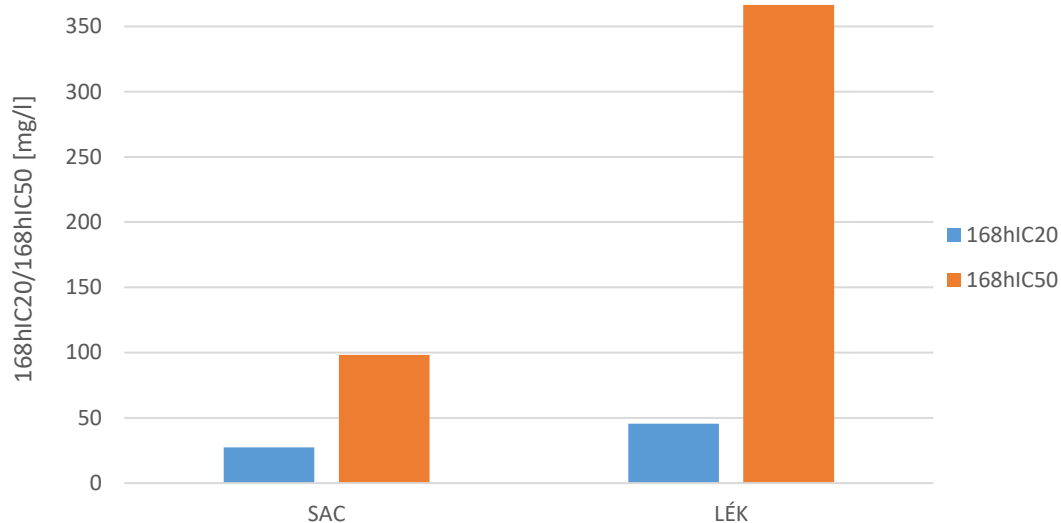


Graf 16: Porovnání citlivosti organismů *T. platyurus* a *D. magna*

Obecně se má za to, že *T. platyurus* je citlivějším organismem pro různé druhy kontaminantů životního prostředí [95]. Z grafu 16 lze pozorovat, že korýš *T. platyurus* je citlivější pro všechna sledovaná sladidla, přičemž například u testování sacharinu je citlivost vyšší pouze mírně, ale pro sukralosu je vyšší až dvojnásobně.

- **Test inhibice růstu okřehku menšího *L. minor***

Na okřehku menším byla testována sladidla acesulfam-K, sacharin, sukralosa a lékořice. V případě testování na acesulfamu-K docházelo ke stimulaci růstu, viz výše, a při testování sukralosy docházelo k pouze malé inhibici, proto nemohla být hodnota 168hIC20 ani 168hIC50 stanovena. V grafu 17 jsou tedy porovnány hodnoty 168hIC20 a 168hIC50 pro sladidla sacharin a lékořice. Sacharin vykazoval, stejně jako v předchozích případech, vyšší toxicitu (168hIC20 = 27,47 mg/l, 168hIC50 = 45,53 mg/l) než lékořice (168hIC20 = 98,40 mg/l, 168hIC50 = 366,4 mg/l).

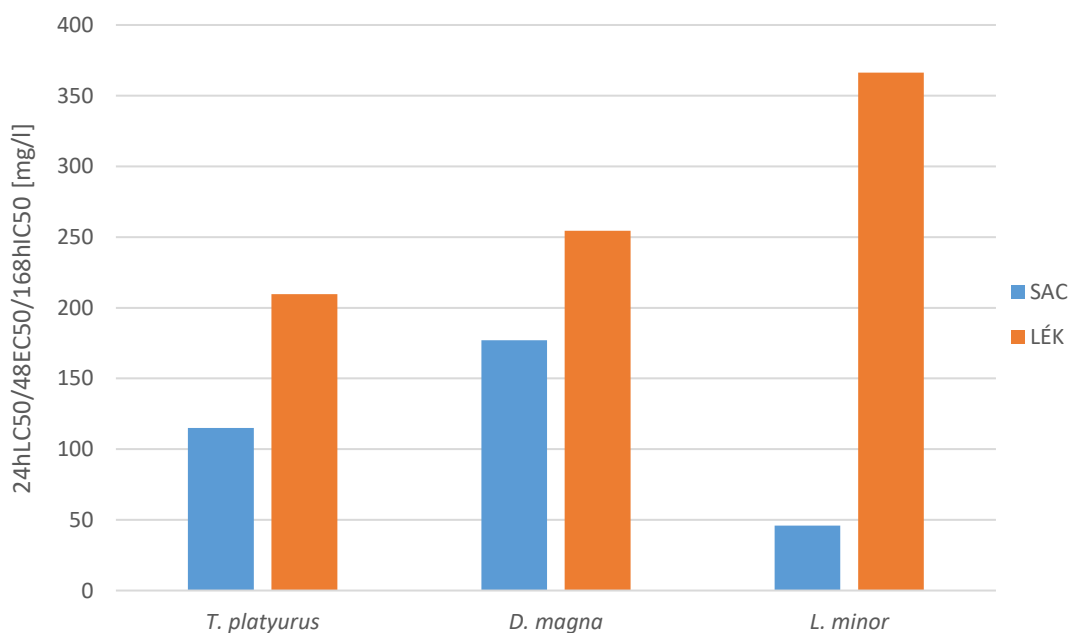


Graf 17: Porovnání hodnot 168hIC20 a 168hIC50 na rostlině *L. minor*

- **Porovnání účinků lékořice na testovacích organismech**

Pro porovnání účinků s umělými sladidly bylo sledováno i přírodní sladidlo lékořice. Toto pozorování nebylo cílem diplomové práce a bylo provedeno pouze pro zajímavost. Lékořice vykazovala ve všech provedených testech vždy jen o trochu nižší toxicitu než sacharin (netýká se testování na okřehku, kde byla toxicita nižší až osmkrát), což je výsledek, který nebyl očekáván vzhledem k tomu, že se jedná o přírodní sladidlo. V grafu 18 je porovnávána toxicita sacharinu a lékořice na všech testovacích organismech.

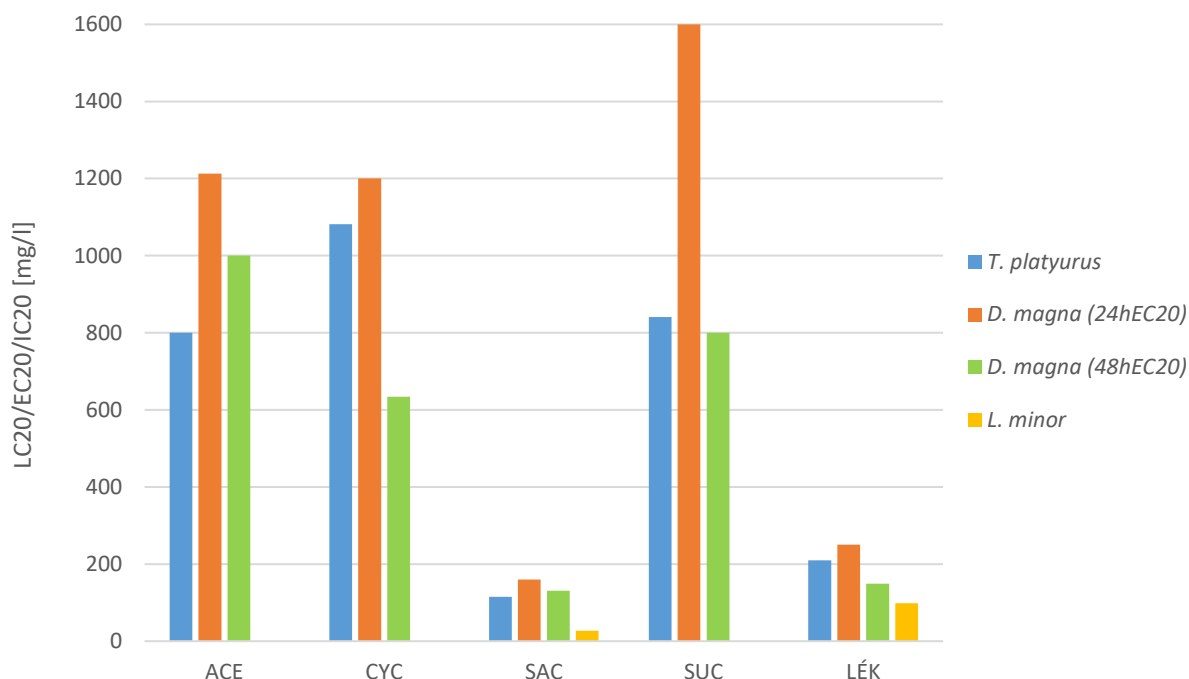
Získané výsledky nemohou být porovnány s dostupnou literaturou, protože se nepodařilo najít žádnou studii, která by hodnotila ekotoxikologický účinek přírodních sladidel.



Graf 18: Porovnání ekotoxicity sacharinu a lékořice

- **Srovnání všech provedených testů a účinků sladidel na testovací organismy**

Na základě všech provedených testů lze pozorovat stejný trend, kdy nejvyšší toxicitu představovala sladidla sacharin a lékořice, viz graf 19, ve kterém jsou zobrazeny hodnoty 24hLC20 pro organismus *T. platyurus*, 24hEC20 a 48hEC20 pro organismus *D. magna* a pro sladidla sacharin a lékořici také 168hIC20 pro rostlinu *L. minor*.



Graf 19: Porovnání ekotoxicity všech sladidel na testovacích organismech

- **Porovnání ekotoxikologických účinků sladidel s literaturou**

Porovnat výsledky s literaturou je obtížné, protože v současné době není dostatek studií, které by se akutní ekotoxicitou umělých sladidel zabývaly.

Výsledky lze porovnat se studií, která se zabývala akutní toxicitou sladidel acesulfamu-K, cyklamátu a sacharinu. Testovacím organismem byl koryš *D. magna* (odečtení testu po 48 hodinách) a rostlina *L. minor* (test po dobu 7 dní). V obou případech sladidla vykazovala nepříznivý účinek až od koncentrace 1000 mg/l. Co se týká výsledků mé diplomové práce a porovnání účinku na *D. magna*, v případě testování acesulfamu-K byl nepříznivý účinek pozorován již v koncentraci 200 mg/l, i když pouze 5%. V koncentraci 1 000 mg/l docházelo k 20% inhibici, což se od uvedené studie liší. To samé lze říci i o cyklamátu, u kterého byl pozorován nepříznivý účinek již při koncentraci 400 mg/l (5 %) a v koncentraci 800 mg/l byla pozorována 20% úmrtnost. Významně odlišné jsou výsledky mé diplomové práce získané testováním sacharinu. Nejen že k nepříznivému účinku docházelo při koncentraci 100 mg/l, ale v koncentraci 400 mg/l došlo již k 100% úmrtnosti.

Při testování acesulfamu-K na okřešku docházelo ke stimulaci růstu rostliny až do koncentrace 900 mg/l, zatímco v koncentraci 1 600 mg/l byla pozorována inhibice rovna 9,83 %. Cyklamát nemůže být s uvedenou studií porovnán, protože k jeho testování na okřešku

z důvodu nutnosti značné spotřeby standardu nedošlo. Pro sacharin jsou i v tomto případě výsledky získané v této diplomové práci odlišné od uvedené studie. K inhibici růstu docházelo při koncentraci 20 mg/l a dokonce i stanovená hodnota 168IC50 byla výrazně nižší, než je koncentrace 1 000 mg/l, při které byl podle zmíněné studie teprve pozorován nepříznivý účinek. Tato hodnota je rovna 45,97 mg/l.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že ekotoxikologický vliv sacharinu je významně odlišný od provedené studie, což potvrzuje i mé testování na organismu *T. platyurus*, u kterého byla hodnota 24hLC50 vypočtena na 208,7 mg/l.

Sledováním semichronické toxicity na rostlině *L. gibba* v jiné studii bylo zjištěno, že až do koncentrace 1 000 mg/l nebyl pozorován žádný nepříznivý účinek. Podobné závěry byly získány i v mé diplomové práci z testování sukralosy na rostlině *L. minor*, kdy při testování nejvyšší zvolené koncentrace (1 800 mg/l) byla inhibice růstu pouze 10,81 %.

V současné době chybí studie, které by byly zaměřené na akutní, popř. chronickou toxicitu umělých sladidel, navíc není k dispozici ani mnoho studií, které by se zabývaly sledováním jiných endpointů, než je úmrtnost organismu po expozici danou koncentrací látky. Pro komplexní hodnocení látek je zapotřebí zkoumat i chronickou toxicitu a fyziologické změny na jiných než organismálních úrovních. V literatuře je popsána studie zabývající se inhibicí popř. aktivací enzymu acetylcholinesterázy organismu *D. magna* po expozici různých koncentrací sukralosy. Bylo prokázáno, že docházelo k aktivaci AChE, což má za následek zvýšený výskyt reaktivních forem kyslíku, které vedou ke vzniku oxidačního stresu. Jednou z dalších možností je i zkoumání, zda dochází k bioakumulaci, a tedy následnému ovlivnění organismu. V literatuře se objevuje popis studie, která se zabývá bioakumulací sukralosy. Testování bioakumulace právě se sukralosou je velmi vhodně zvolené, neboť toto sladidlo prochází ČOV a není dostatečně efektivně odstraňováno, proto se do životního prostředí dostává v největším množství. Studie zahrnovala testování na různých trofických úrovních (sladkovodní řasa *P. subcapitata*, perloočka *D. magna* a rybka *D. rerio*) a organismy byly vystaveny koncentracím 10 mg/l a 100 mg/l. Hodnota BCF, která popisuje perzistentní, bioakumulativní a toxickou látku je $\geq 2\ 000$, což v případě této studie nebylo překročeno, a proto se předpokládá, že sukralosa nevykazuje bioakumulativní charakter.

Dalším krokem ke komplexnímu hodnocení umělých sladidel v životním prostředí by bylo provedení studií chronické toxicity. Ty by mohly mnohem přesněji určit ekotoxikologický vliv na ekosystém, protože v této chvíli se do životního prostředí dostávají pouze nízké koncentrace, nicméně nejedná se o krátkodobé působení, ale o působení nízkých dávek po konstantní dobu.

Je třeba počítat i s tím, že sladidla nejsou jediné látky, které pronikají ČOV. Stále nejsou vyvinuty efektivní metody na odstranění například léčiv z odpadní vody. Proto by dále měla být pozornost zaměřena i na testování takových směsí, ve kterých mohou sladidla vykazovat synergický efekt.

8. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo posoudit ekotoxikologický vliv umělých sladidel na ekosystém. Pro komplexnější uchopení problematiky byla provedena také analýza umělých sladidel v odpadní a přečištěné vodě, na základě které bylo zjištěno, jaké koncentrace sladidel mohou pronikat do životního prostředí.

Umělá sladidla představují velmi rozšířenou skupinu látek, které nachází uplatnění především v potravinářském průmyslu jako aditiva. Vyskytují se ve velkém množství potravin a nápojů. Využívají se především proto, že v porovnání se sacharosou se vyznačují mnohem vyšší sladivostí a na rozdíl od cukru nezvyšují kalorickou hodnotu potravin a nápojů. I přes značné rozpory týkající se jejich zdravotní závadnosti pro lidský organismus se předpokládá, že jejich spotřeba bude každoročně stoupat. V potravinách a nápojích se nejčastěji vyskytují sladidla acesulfam-K, cyklamát, sacharin a sukralosa. Jelikož se jedná o synteticky vyrobené látky, lidské tělo je převážně neumí metabolizovat, a tudíž se vylučováním dostávají do odpadních vod, které jsou přiváděny na čistírnu odpadních vod. Je známo, že sukralosa a acesulfam-K prochází technologickým procesem čištění, jejich eliminace je minimální a takto se dostávají do životního prostředí.

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu vzorků odpadní vody a vzorků přečištěné odpadní vody, které byly odebírány z čistírny odpadních vod v Modřicích – celkem tři 24hodinové slévané vzorky. Vzorky byly analyzovány kapalinovou chromatografií v tandemu s hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu AS bylo potřeba vyvinout metodu jejich stanovení, což představovalo optimalizaci velkého množství parametrů. Na přítoku odpadní vody byla stanovena všechna výše zmíněná sladidla v koncentracích pohybujících se v rozmezí od 1,40 µg/l do 22,67 µg/l, přičemž v nejmenším množství byl detekován acesulfam-K, dále pak cyklamát a sacharin a nejvyšší koncentrace představovala sukralosa. Byla provedena také analýza přečištěné odpadní vody odebrané na odtoku. Při této analýze bylo zjištěno, že se do recipientu dostává převážně sukralosa, které bylo během čistícího procesu odbouráno pouze kolem 6 %. Dalším sladidlem, které bylo na odtoku stanoveno, byl sacharin, nicméně ten byl odstraněn až z 95 %. Ostatní sladidla byla pod mezí detekce zvolené metody stanovení.

Případný vliv na akvatické organismy byl zjišťován testováním umělých sladidel na sladkovodních korýších *T. platyurus* a *D. magna*, dále na akvatické rostlině *L. minor* a byl proveden také screeningový test na bakterii *V. fischeri*, který bohužel neposkytl spolehlivé výsledky, z důvodu nesplnění podmínek validity testu. Nejvíce toxický efekt představovalo sladidlo sacharin, pro který byly stanoveny hodnoty 24hLC50 na 115 mg/l pro organismus *T. platyurus*, 48hEC50 na 131,2 mg/l pro organismus *D. magna* a 168hEC50 na 27,97 mg/l pro rostlinu *L. minor*. Sacharin vykazoval nejvyšší toxicitu i v případě screeningového testu na *V. fischeri*. Podobných výsledků bylo dosaženo i při testování lékořice (přírodní sladidlo, které bylo testováno pouze pro doplnění poznatků). Ostatní sladidla, tedy acesulfam-K, cyklamát a sukralosa, vykazovala podobnou toxicitu pro všechny testovací organismy.

Ze získaných výsledků vyplývá, že akutní ekotoxicita umělých sladidel je nízká a k pozorovaným škodlivým účinkům docházelo až při vyšších koncentracích, které se v současné době do recipientů jak nedostávají, tak se v nich zatím ani nevyskytují. Nicméně, pomocí výše uvedených testů byla stanovována akutní toxicita, ale dalším krokem v hodnocení umělých sladidel by mělo být testování chronické toxicity, jelikož se v současné chvíli jedná spíše o působení nízkých dávek po trvalou dobu. Vliv umělých sladidel na ekosystém je problematika, která by měla být nadále řešena. Předpokládá se, že spotřeba AS poroste, a tudíž bude docházet ke stále většímu průniku těchto látek do životního prostředí (v případě, že nebude nalezen postup jejich efektivnějšího odstranění z odpadních vod). Další otázkou v této oblasti je osud AS v životním prostředí a jejich působení společně s dalšími kontaminanty.

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [2] CHATTOPADHYAY, Sanchari, Utpal RAYCHAUDHURI a Runu CHAKRABORTY. Artificial sweeteners – a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014, **51**(4), 611-621. DOI: 10.1007/s13197-011-0571-1. ISSN 0022-1155. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-011-0571-1>
- [3] SHANKAR, Padmini, Suman AHUJA a Krishnan SRIRAM. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*. 2013, **29**(11-12), 1293-1299. DOI: 10.1016/j.nut.2013.03.024. ISSN 08999007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900713002190>
- [4] KOKOTOU, Maroula, Alexandros ASIMAKOPOULOS a Nikolaos THOMAIDIS. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Analytical Methods*. 2012, **4**(10), 3057-3071. DOI: 10.1039/c2ay05950a. ISSN 1759-9660. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay05950a>
- [5] ELKAIM, Yuri. Zero-Calorie Sweeteners Just As Bad As Sugar (Perhaps Even Worse) At Packing on FAT... And a Host of Other Health Problems!. In: [Http://www.supernutritionacademy.com](http://www.supernutritionacademy.com) [online]. b.r. [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: <http://www.supernutritionacademy.com/artificial-sweeteners-side-effects/>
- [6] SYLVETSKY, Allison a Kristina ROTHER. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology*. 2016, **164**(), 446-450. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.03.030. ISSN 00319384. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938416301184>
- [7] ARBELÁEZ, Paula, Francesc BORRULL, Eva POCURULL a Rosa MARCÉ. Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1393**, 106-114. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.03.035. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967315004306>
- [8] HODGIN, Greg. The History, Synthesis, Metabolism and Uses of Artificial Sweeteners. In: [Http://monsanto.unveiled.info](http://monsanto.unveiled.info) [online]. 2007 [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: <http://monsanto.unveiled.info>
- [9] SMRČKOVÁ, Štěpánka a Jan BINDZAR. Náhradní sladidla jako polutanty vody. *Chemické Listy*. 2014, **108**(12), 1125-1132.
- [10] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2011-2012. ISBN 978-80-7387-469-8.

- [11] KROGER, Manfred, Kathleen MEISTER a Ruth KAVA. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006, **5**(2), 35-47. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x. ISSN 1541-4337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x>
- [12] BUTCHKO, Harriett, W.Wayne STARGEL, C.Phil COMER et al. Aspartame: Review of Safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2002, **35**(2), 1-93. DOI: 10.1006/rtph.2002.1542. ISSN 02732300. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230002915424>
- [13] PEPINO, M. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology & Behavior*. 2015, **152**, 450-455. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.06.024. ISSN 00319384. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938415003728>
- [14] MATTES, Richard. Low calorie sweeteners: Science and controversy. *Physiology & Behavior*. 2016, **164**, 429-431. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.01.005. ISSN 00319384. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416000020>
- [15] FOWLER, Sharon. Low-calorie sweetener use and energy balance: Results from experimental studies in animals, and large-scale prospective studies in humans. *Physiology & Behavior*. 2016, **164**(), 517-523. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.04.047. ISSN 00319384. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416301846>
- [16] KLESCHT, Vladimír, Iva HRNČIŘÍKOVÁ a Lucie MANDELOVÁ. *Éčka v potravinách*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2006. Zdraví pro každého (Computer Press). ISBN 80-251-1292-6.
- [17] *Směrnice Evropského parlamentu a rady 94/35/ES: o náhradních sladidlech pro použití v potravinách*. 30. června 1994. 1994.
- [18] *Vyhláška č. 4/2008 Sb.: kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin*. 2008.
- [19] GREENLY, Larry. A doctor's guide to sweeteners. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2003, **2**(2), 80-86. DOI: 10.1016/S0899-3467(07)60049-4. ISSN 15563707. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899346707600494>
- [20] MORTENSEN, Alicja. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. 2006, **3**(50), 104-116. DOI: 10.1080/17482970600982719. ISSN 1748-2976.
- [21] VYMAZAL, Jan a Tereza DVOŘÁKOVÁ BŘEZINOVÁ. Removal of saccharin from municipal sewage: The first results from constructed wetlands. *Chemical Engineering Journal*. 2016, **306**, 1067-1070. DOI: 10.1016/j.cej.2016.08.043. ISSN 13858947. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894716311172>
- [22] REACH. In: *European Commission* [online]. 2016 [cit. 2016-12-03]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm

- [23] Které chemické látky vzbuzují obavy?. In: *European chemicals agency* [online]. b.r. [cit. 2016-12-03]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/chemicals-in-our-life/which-chemicals-are-of-concern>
- [24] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1907/2006: o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek*. In: . 2006. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1907-20161011&from=EN>
- [25] EVROPSKÁ KOMISE. *Souhrnná zpráva o REACH*. Brusel, 2013. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2013:0049:FIN:CS:PDF>
- [26] REACH. In: *FOODNET Informační systém PK ČR* [online]. b.r. [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://www.foodnet.cz/slozka/?jmeno=REACH&id=937>
- [27] VON RYMON LIPINSKI, Gert-Wolfhard. The new intense sweetener Acesulfame K. *Food Chemistry*. 1985, **16**(3-4), 259-269. DOI: 10.1016/0308-8146(85)90120-7. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814685901207>
- [28] NABORS, Lyn. *Alternative sweeteners*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, 2001. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 112. ISBN 08-247-0437-1. Dostupné také z: http://fars.itvhe.ac.ir/_fars/Documents/2001-19936.pdf
- [29] HUI, Y. *Handbook of food science, technology, and engineering*. 2. Boca Raton: CRC Press, 2006. Food science and technology (Taylor. ISBN 08-493-9849-5. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=brdM8-ahRg4C&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [30] MARINOVICH, Marina, Corrado GALLI, Cristina BOSETTI, Silvano GALLUS a Carlo LA VECCHIA. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, **60**(), 109-115. DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.040. ISSN 02786915. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151300495X>
- [31] NOLLET, Leo a Fidel TOLDRA. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2013. ISBN 14-398-3084-3.
- [32] NOLLET, Leo. *Food analysis by HPLC*. 2nd ed., rev. and exp. New York: Marcel Dekker, 2000. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 100. ISBN 08-247-8460-X.
- [33] ČOPÍKOVÁ, Jana, Jitka MORAVCOVÁ, Zdeněk WIMMER, Lubomír OPLETAL, Oldřich LAPČÍK a Pavel DRAŠAR. Náhradní sladidla. *Chemické Listy*. 2013, **107**(11), 867-874.
- [34] NOLLET, Leo. *Handbook of food analysis: Residues and other food component analysis*. 2. ed., rev. New York, NY [u.a.]: Dekker, 2004. ISBN 08-247-5037-3.

- [35] SUNDH, Ulla. Scientific Opinion on the safety evaluation of the substance, 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one 1,1-dioxide, sodium salt, CAS No. 128-44-9, for use in food contact materials. *EFSA Journal*. 2012, **10**(3), 2640-2649. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2640. ISSN 18314732. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2012.2640>
- [36] Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. *U.S. FOOD & DRUG Administration* [online]. 2015 [cit. 2016-11-17]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm#Saccharin>
- [37] GROTZ, V. a Ian MUNRO. An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009, **55**(1), 1-5. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.05.011. ISSN 02732300. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230009000786>
- [38] AGUILAR, Fernando. Safety of the proposed extension of use of sucralose (E 955) in foods for special medical purposes in young children. *EFSA Journal*. 2016, **14**(1), 4361-4362. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4361. ISSN 18314732. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4361>
- [39] RIZZATO, Giovanni, Elisa SCALABRIN, Marta RADAELLI, Gabriele CAPODAGLIO a Oreste PICCOLO. A new exploration of licorice metabolome. *Food Chemistry*. 2017, **221**, 959-968. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.068. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319173>
- [40] ASL, Marjan a Hossein HOSSEINZADEH. Review of Pharmacological Effects of Glycyrrhiza sp. and its Bioactive Compounds. *Phytotherapy Research*. 2008, **22**(6), 709-724. DOI: 10.1002/ptr.2362. ISSN 0951418x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2362>
- [41] Glycirrhizin acid. *World Health Organization* [online]. b.r. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=4366>
- [42] STOLTE, Stefan, Stephanie STEUDTE, Nils SCHEBB, Ina WILLENBERG a Piotr STEPNOWSKI. Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside. *Environment International*. 2013, **60**, 123-127. DOI: 10.1016/j.envint.2013.08.010. ISSN 01604120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412013001736>
- [43] TRAN, Ngoc, Jiangyong HU, Jinhua LI a Say ONG. Suitability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater. *Water Research*. 2014, **48**(1), 443-456. DOI: 10.1016/j.watres.2013.09.053. ISSN 00431354. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135413007653>

- [44] WIKLUND, Ann-Kristin, Magnus BREITHOLTZ, Bengt-Erik BENGTTSSON a Margaretha ADOLFSSON-ERICI. Sucralose – An ecotoxicological challenger?. *Chemosphere*. 2012, **86**(1), 50-55. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.08.049. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511010162>
- [45] SCHEURER, Marco, Heinz-J. BRAUCH a Frank LANGE. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, **394**(6), 1585-1594. DOI: 10.1007/s00216-009-2881-y. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-2881-y>
- [46] LANGE, Frank, Marco SCHEURER a Heinz-J. BRAUCH. Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **403**(9), 2503-2518. DOI: 10.1007/s00216-012-5892-z. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-5892-z>
- [47] BATCHU, Sudha, Cesar RAMIREZ a Piero GARDINALI. Rapid ultra-trace analysis of sucralose in multiple-origin aqueous samples by online solid-phase extraction coupled to high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(13), 3717-3725. DOI: 10.1007/s00216-015-8593-6. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-8593-6>
- [48] SANG, Ziye, Yanan JIANG, Yeuk-Ki TSOI a Kelvin LEUNG. Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Research*. 2014, **52**(), 260-274. DOI: 10.1016/j.watres.2013.11.002. ISSN 00431354. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135413009019>
- [49] SCHIFFMAN, Susan a Kristina ROTHER. Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2013, **16**(7), 399-451. DOI: 10.1080/10937404.2013.842523. ISSN 1093-7404. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10937404.2013.842523>
- [50] HLAVÍNEK, Petr, Jan MIČÍN, Petr PRAX, Petr HLUŠTÍK a Radim MIFEK. *Stokování a čištění odpadních vod*. Brno, 2006, 142 s. Studijní opora. Vysoké učení technické v Brně.
- [51] POYATOS, J., M. MUÑO, M. ALMECIJA, J. TORRES, E. HONTORIA a F. OSORIO. Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: State of the Art. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2010, **205**(1-4), 187-204. DOI: 10.1007/s11270-009-0065-1. ISSN 0049-6979. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11270-009-0065-1>
- [52] PUNTURAT, Voramin a Kuo-Lin HUANG. Degradation of acesulfame in aqueous solutions by electro-oxidation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2016, **63**, 286-294. DOI: 10.1016/j.jtice.2016.03.016. ISSN 18761070. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876107016001401>

- [53] LIN, Heng, Nihal OTURAN, Jie WU, Virender SHARMA, Hui ZHANG a Mehmet OTURAN. Removal of artificial sweetener aspartame from aqueous media by electrochemical advanced oxidation processes. *Chemosphere*. 2016, **167**, 220-227. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.143. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516313558>
- [54] PŁOTKA-WASYLKA, Justyna, Natalia SZCZEPAŃSKA, Miguel DE LA GUARDIA a Jacek NAMIEŚNIK. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, **77**, 23-43. DOI: 10.1016/j.trac.2015.10.010. ISSN 01659936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615300558>
- [55] DE LA GUARDIA, M. a S. ARMENTA. *Green analytical chemistry theory and practice*. 1st. Oxford: Elsevier, 2011, 268 s. ISBN 04-445-3710-4.
- [56] SIMPSON, Nigel. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. New York: CRC Press, 2000, 528 s. ISBN 978-142-0056-242. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=olcohx9gDdK&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [57] SALVATORE FANALI, Paul. *Liquid Chromatography Fundamentals and Instrumentation*. 1st ed. Burlington: Elsevier Science, 2013, 520 s. ISBN 01-241-5867-6.
- [58] NIESSEN, W. *Liquid chromatography--mass spectrometry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: CRC Press, 1999, 648 s. Chromatographic science. ISBN 08-247-1936-0. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=oSnKlgDBzJEC&dq=liquid+chromatography&hl=cs&source=gbs_navlinks_s
- [59] LEBEDEV, Albert. *Comprehensive environmental mass spectrometry*. Reprint. Glendale, AZ: ILM Publications, 2012, 510 s. ISBN 19-067-9912-1. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=izzX-b6Gc4oC&dq=mass+spectrometry&hl=cs&source=gbs_navlinks_s
- [60] DE HOFFMANN, Edmond, Vincent STROOBANT, ed. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, 2007, 502 s. ISBN 978-0-470-03311-1.
- [61] HAM, Bryan a Aihui MAHAM. *Analytical chemistry: a chemist and laboratory technician's toolkit*. Hoboken, New Jersey: John Wiley, 2016, 680 s. ISBN 11-187-1484-9. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=vFa-CgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [62] MCMASTER., Marvin. *LC/MS a practical user's guide*. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2005, 184 s. ISBN 978-047-1736-578.

- [63] BARCELO, Damia. *Journal of chromatography library: Applications of LC-MS in environmental chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1996, 540 s. ISBN 978-008-0858-678. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=_U6nuIivmD8C&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [64] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Hmotnostní spektrometrie: Přednáška č. 5: analyzátory*. FCH VUT Brno, 2016.
- [65] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Analytická chemie II: Přednáška 10: Hmotnostní spektrometrie*. FCH VUT Brno, 2014.
- [66] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *Instrumentální a strukturní analýza: Přednáška č. 5: Hmotnostní spektrometrie - princip, vývoj, instrumentace*. FCH VUT Brno, 2015.
- [67] BARCELO, Damia, Sandra PEREZ a Peter EICHHORN. *Comprehensive Analytical Chemistry Series: Applications of Time-Of-Flight and Orbitrap Mass Spectrometry in Environmental, Food, Doping, and Forensic Analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 9780444635723. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=J5nBCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- [68] GROSS, Jürgen. *Mass spectrometry: a textbook*. 2nd ed. Berlin: Springer, 2011, 753 s. ISBN 978-3-642-10709-2.
- [69] PITT, James. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009, **30**(1), 19-34.
- [70] ORDÓÑEZ, Edgar, José QUINTANA, Rosario RODIL a Rafael CELA. Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1256**, 197-205. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.07.073. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312011442>
- [71] ZYGLER, Agata, Andrzej WASIK a Jacek NAMIEŚNIK. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. *Talanta*. 2010, **82**(5), 1742-1748. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.070. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010006004>
- [72] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 2011, 243, [22] s. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [73] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOŤÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2009, 199 s. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [74] BLAHA, Karel. Hodnocení rizik chemických látek. *Chemické listy*. 1997, **91**(10), 824-828.
- [75] KOČÍ, Vladimír. Význam testů toxicity pro hodnocení vlivů látek na životní prostředí. *Chemické listy*. 2006, (100).

- [76] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003, 226 s. ISBN 80-708-0521-8.
- [77] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. Biologické testy toxicity. *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2016-11-09]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B023
- [78] MARŠÁLEK, Blahoslav. *Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití*. Brno, 2008. Dostupné také z: http://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi5620/um/5135634/1.Prehled_a_rozdeleni_EB_text.pdf
- [79] SOH, Lindsay, Kristin CONNORS, Bryan BROOKS a Julie ZIMMERMAN. Fate of Sucralose through Environmental and Water Treatment Processes and Impact on Plant Indicator Species. *Environmental Science*. 2011, **45**(4), 1363-1369. DOI: 10.1021/es102719d. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es102719d>
- [80] HUGGETT, D.B. a K.I. STODDARD. Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, **49**(10), 2575-2579. DOI: 10.1016/j.fct.2011.06.073. ISSN 02786915. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691511003176>
- [81] LILLICRAP, Adam, Katherine LANGFORD a Knut TOLLEFSEN. Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011, **30**(3), 673-681. DOI: 10.1002/etc.433. ISSN 07307268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.433>
- [82] ERIKSSON WIKLUND, Ann-Kristin, Margaretha ADOLFSSON-ERICI, Birgitta LIEWENBORG, Elena GOROKHOVA a Silvana ALLODI. Sucralose Induces Biochemical Responses in *Daphnia magna*. *PLoS ONE*. 2014, **9**(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0092771. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092771>
- [83] AMIARD-TRIQUET, Claude. Introduction. *Aquatic Ecotoxicology*. Elsevier, 2015, , 1-23. DOI: 10.1016/B978-0-12-800949-9.00001-2. ISBN 9780128009499. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009499000012>
- [84] *Kvalita vod - Stanovení akutní toxicity pro *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca)*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2012. Dostupné také z: <http://www.tzb-info.cz/normy/csn-iso-14380-2012-08>
- [85] Thamnotoxkit F Test Procedure. In: [Http://www.microbiotests.be](http://www.microbiotests.be) [online]. b.r. [cit. 2016-11-30]. Dostupné z: <http://www.microbiotests.be/toxkits/Thamnotoxkit%20F%20slide%20show.pdf>

- [86] *Test akutní toxicity na perloočkách Daphnia magna*. Praha, 2010. Dostupné také z: http://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/05_Daphnia.pdf. Laboratorní návod č. 5. Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT.
- [87] SVOBODOVÁ, Zdeňka. *Ekotoxikologie - praktická cvičení: Část I. Testy toxicity na organismech vodního prostředí*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000. ISBN 80-851-1495-X.
- [88] *OECD Guidelines for the testing of chemicals: Lemna sp. Growth Inhibition Test 221*. In: . 2002. Dostupné také z: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>
- [89] *Test toxicity při semichronické expozici vůči okřešku menšímu (Lemna minor L.)*. Praha, 2010. Dostupné také z: https://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/04_okrehek.pdf. Laboratorní návod č. 4. Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT v Praze.
- [90] *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 221: Lemna sp. growth inhibition test*. Paris: OECD Pub, 2006. ISBN 978-661-0606-702. Dostupné také z: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9722101e.pdf?expires=1480535746&id=id&accname=guest&checksum=FA1A6C05E22126859A4C454785042DDC>
- [91] *Test zhášení bioluminiscence bakterií Vibrio fischeri*. Praha, 2010. Dostupné také z: http://old.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/07_Vibrio.pdf. Laboratorní návod č. 7. Ústav chemie ochrany prostředí, VŠCHT.
- [92] PAVLOVSKÝ, Jiří. *Cvičení z ekotoxikologických testů*. Ostrava, 2015. Dostupné také z: <https://www.fmfi.vsb.cz/export/sites/fmfi/617/cs/ke-stazeni/EKOTOXIKOLOGICKE-TESTY-cviceni.pdf>. VŠB-TUO, katedra chemie.
- [93] Brněnské vodárny a kanalizace. *ČOV Brno-Modřice* [online]. b.r. [cit. 2017-04-14].
- [94] *ČOV Modřice - technický popis*. b.r. Dostupné také z: <http://www.bvk.cz/ospolecnosti/odvadeni-a-cisteni-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>
- [95] KIM, Joon-Woo. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of Toxicological Sciences*. 2009, **34**(2), 227-232. DOI: 10.2131/jts.34.227. ISSN 0388-1350. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jts/34.227?from=CrossRef>
- [96] KOČÍ, Vladimír, Tomáš RAKOVICKÝ a Andrej ŠVAGR. Testy akutní a semichronické toxicity. In: [Http://ekotoxikologie.sweb.cz](http://ekotoxikologie.sweb.cz) [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001 [cit. 2016-11-12]. Dostupné z: <http://ekotoxikologie.sweb.cz/toxlab/vyuka/obecna.htm>
- [97] Aspartame. [Http://www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) [online]. b.r. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.118630.html?rid=c91b50c0-0320-43a6-9fb9-0b00fd0ade26>
- [98] Saccharine. [Http://www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) [online]. b.r. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4959.html?rid=0be9a97d-1d2d-45f7-88c5-6f2894883c68&page_num=0

- [99] Cyclamate. *Http://www.chemspider.com* [online]. b.r. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2618330.html?rid=4cba18d8-d00e-4b3d-9708-a5e01201fe23>
- [100] Acetsulfame K. *Http://www.chemspider.com* [online]. b.r. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.55940.html?rid=5f534822-5d25-4af4-9421-0758ce31a2c6&page_num=0
- [101] Sucralose. *Http://www.chemspider.com* [online]. b.r. [cit. 2016-10-20]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.64561.html?rid=db4cfb41-72cd-4ee1-a892-f8d438a2c3f8>
- [102] SUBEDI, Bikram a Kurunthachalam KANNAN. Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environmental Science and Technology*. 2014, **48**(23), 13668-13674. DOI: 10.1021/es504769c. ISSN 0013-936x. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es504769c>
- [103] SU, Ping, Ruoyu WANG, Yang YU a Yi YANG. Microwave-assisted synthesis of ionic liquid-modified silica as a sorbent for the solid-phase extraction of phenolic compounds from water. *Anal. Methods*. 2014, **6**(3), 704-709. DOI: 10.1039/C3AY41771A. ISSN 1759-9660. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3AY41771A>
- [104] EDWARDS, Cathrina, Megan ROSSI, Christopher CORPE, Peter BUTTERWORTH a Peter ELLIS. The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, **56**, 158-166. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.008. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415301539>
- [105] GATES, Paul. Electrospray Ionisation (ESI). In: *University of Bristol* [online]. Bristol, United Kingdom, 2014 [cit. 2016-12-04]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/esi-ionisation.xhtml>
- [106] MICHALCOVÁ, Dana. Lemna minor. In: *Botanická fotogalerie* [online]. 2010 [cit. 2017-01-19]. Dostupné z: http://www.botanickafotogalerie.cz/en/Lemna_minor/
- [107] NOVOTNÁ, Kateřina. *Toxicita nanomateriálů vůči vodním koryšům*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav životního prostředí, 2012. Bakalářská práce. Vedoucí práce Doc. Ing. Vladimír Kočí, Ph.D.

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AChe	acetylcholinesterase; acetylcholinesteráza
ACE	acesulfame-K; acesulfam-K
ADI	Acceptable Daily Intake; přijatelná denní hodnota
ALI	alimate; alimát
AOP	Advanced Oxidation Processes; pokročilé oxidační procesy
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization; chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization; fotoionizace za atmosférického tlaku
AS	artificial sweeteners; umělá sladidla
ASP	aspartame; aspartam
BCF	bioconcentration factor; biokoncentrační faktor
CYC	cyclamate; cyklamát
ČOV	čistírna odpadních vod
ECHA	European Chemical Agency; Evropská agentura pro chemické látky
ESI	Electrospray Ionization, elektrosprej
EFSA	European Food Safety Authority; Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
IARC	International Agency for Research on Cancer; Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
LC	Liquid Chromatography; kapalinová chromatografie
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level; nejnižší dávka nebo koncentrace látky, při které je ještě pozorován nepříznivý účinek
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration; nejnižší koncentrace, při níž je pozorován účinek
MS	Mass Spectrometry; hmotnostní spektrometrie
NEO	neotame; neotam
NHDC	neohesperidin dihydrochalcone; neohesperidin dihydrochalkon
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level; nejvyšší dávka nebo koncentrace, při které ještě není pozorován nepříznivý účinek
NOEC	No Observed Effect Concentration; koncentrace, při níž není pozorován žádný negativní účinek
NOEL	No Observed Effect Level; nejvyšší dávka bez pozorovaného účinku
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development; Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of chemicals; Nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
SAC	saccharin; sacharin
SCF	Scientific Commite on Food; Vědecký výbor pro potraviny
SPE	Solid Phase Extraction; extrakce tuhou fází
SUC	sucralose; sukralosa

11. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Optimalizace kapalinově chromatografické separace

Příloha 2: Produktová spektra acesulfamu-K při optimalizaci LC/MS/MS za stejných podmínek

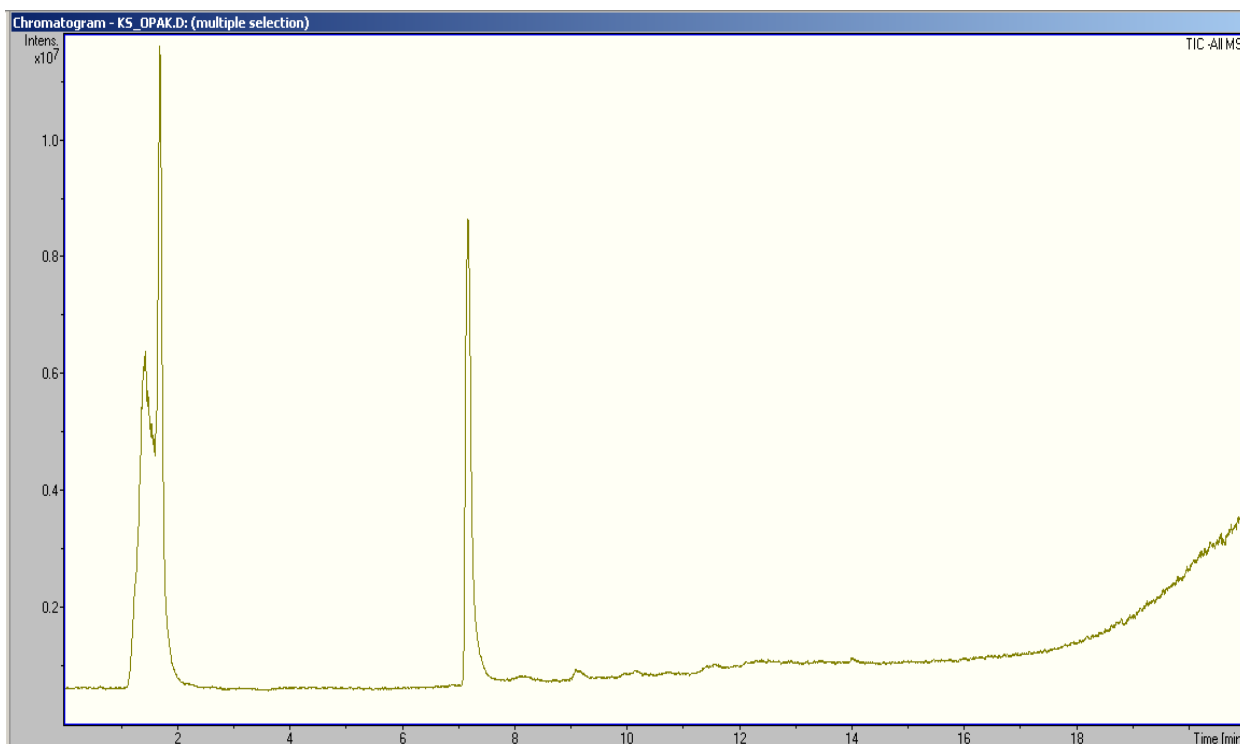
Příloha 3: Kalibrační závislosti – výtěžnost kolonky STRATA-X

Příloha 3: Kalibrační závislosti – přítok

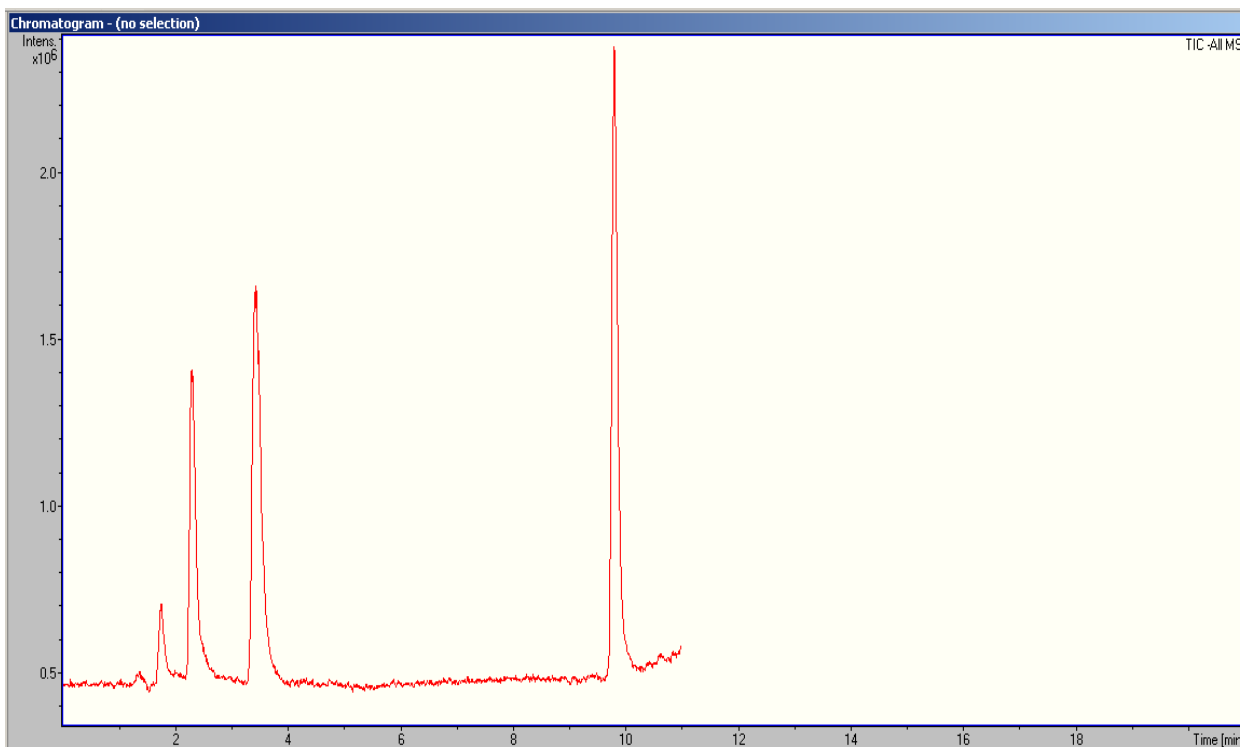
Příloha 4: Kalibrační závislosti – odtok

Příloha 5: Převedení úmrtnostních dat v procentech na probity

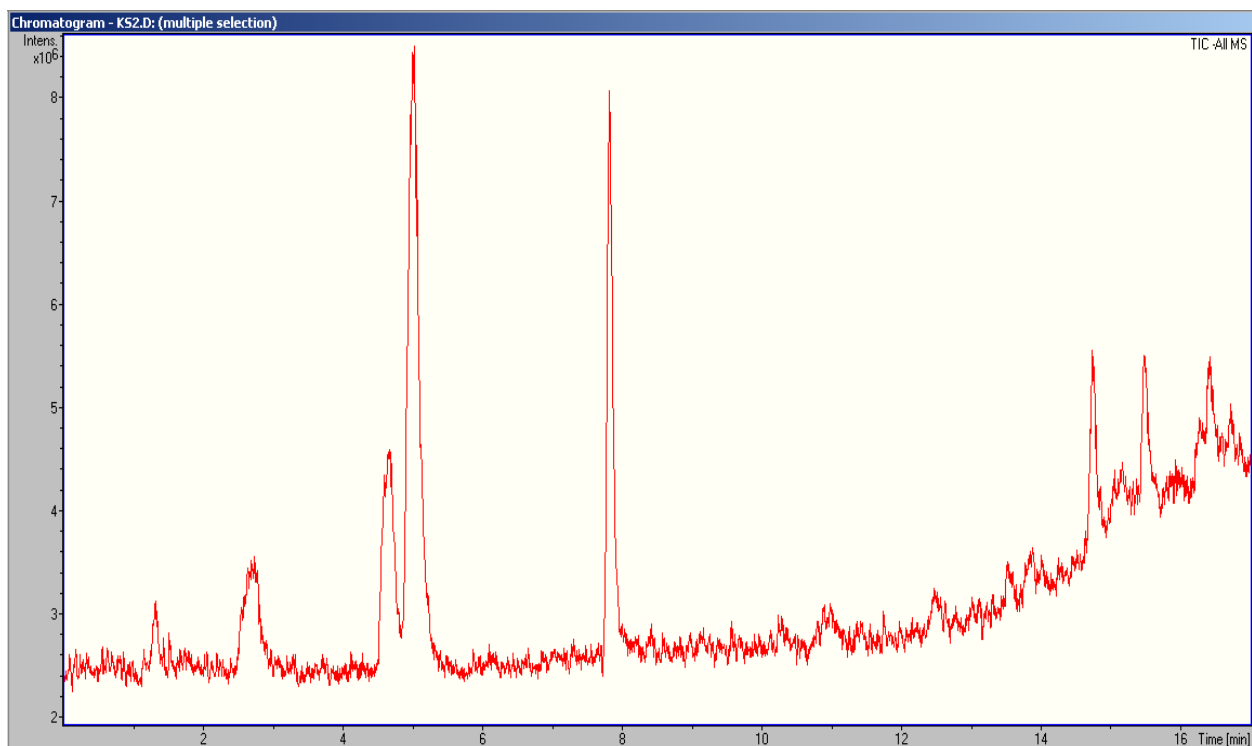
Příloha 1: Optimalizace kapalinově chromatografické separace



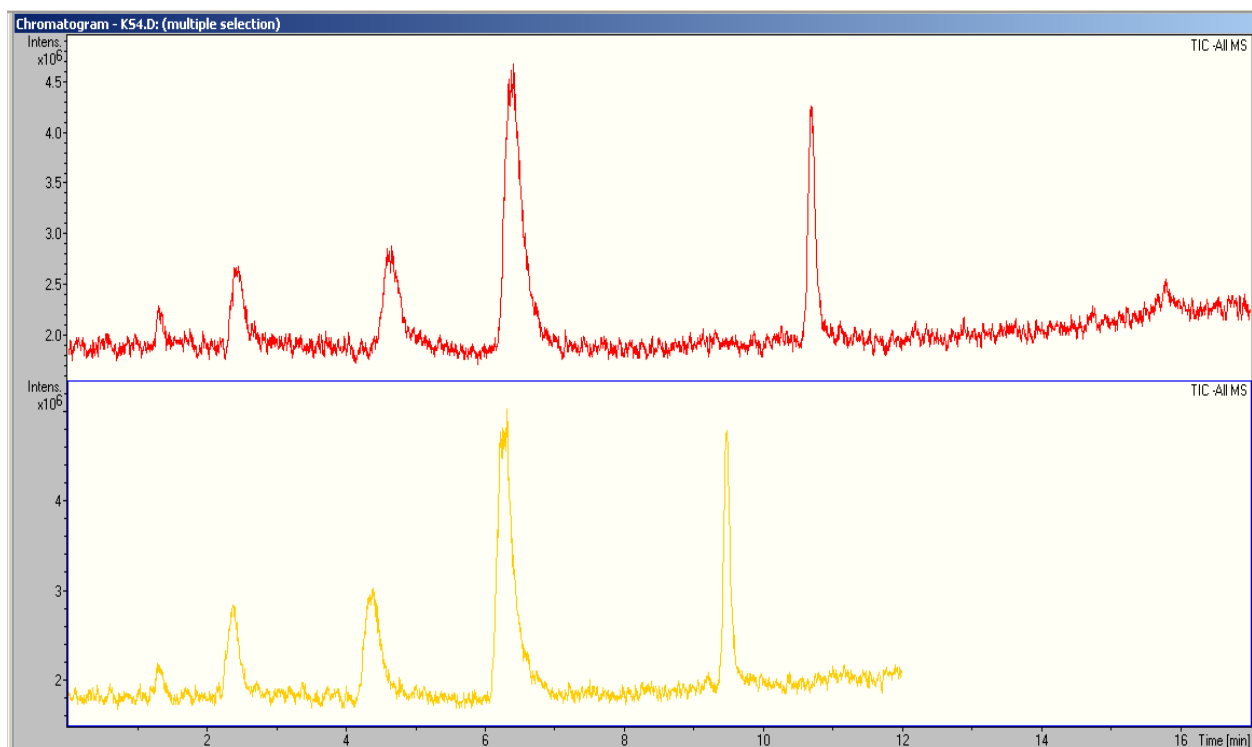
Obrázek 24: Ukázka chromatogramu, mobilní fáze acetonitril/voda



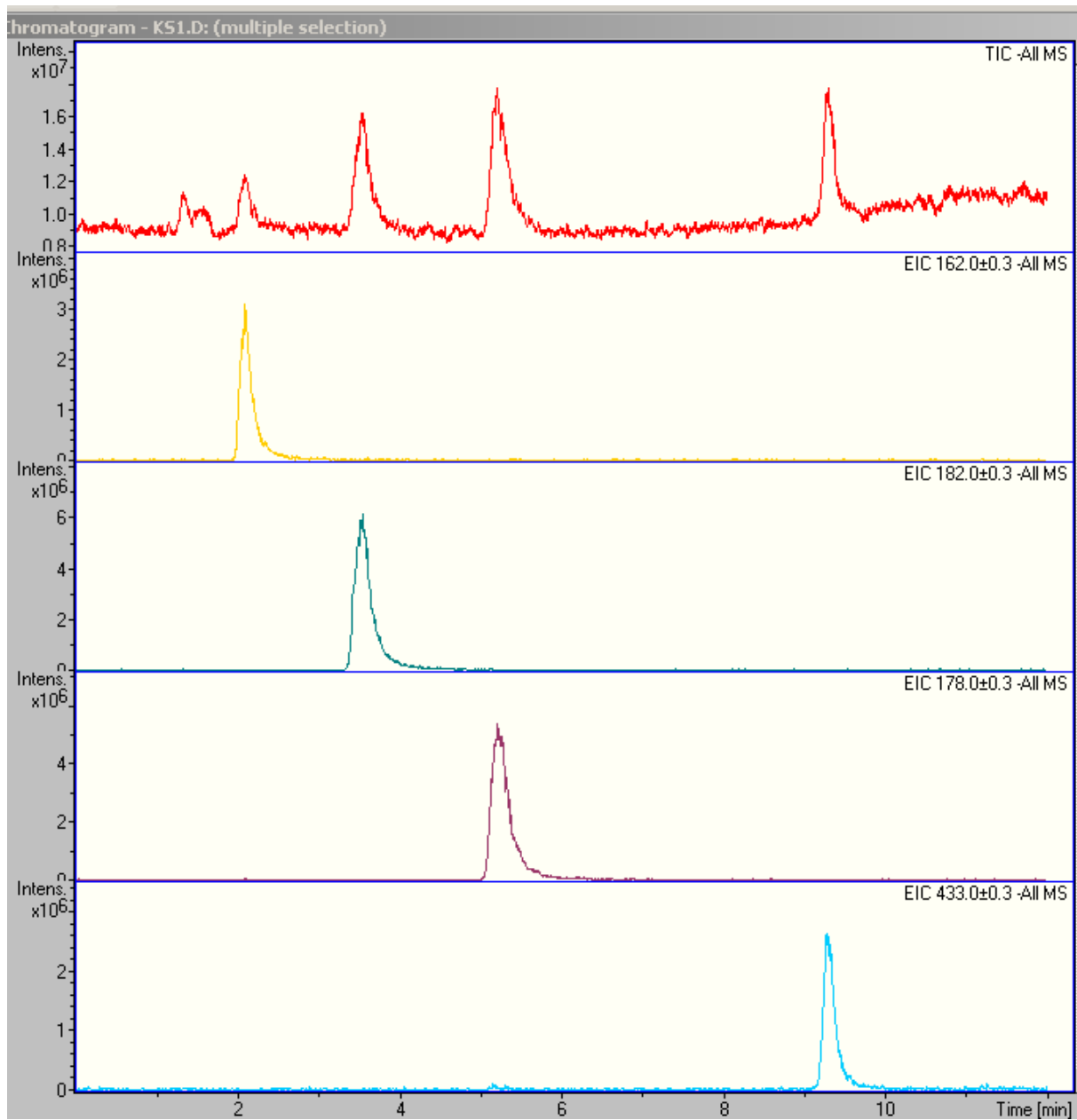
Obrázek 25: Ukázka chromatogramu, mobilní fáze methanol/Milli-Q voda + 1 mM octan amonný



Obrázek 26: Ukázka chromatogramu, mobilní fáze acetonitril/Milli-Q voda, okyseleno HCOOH na pH 2,5

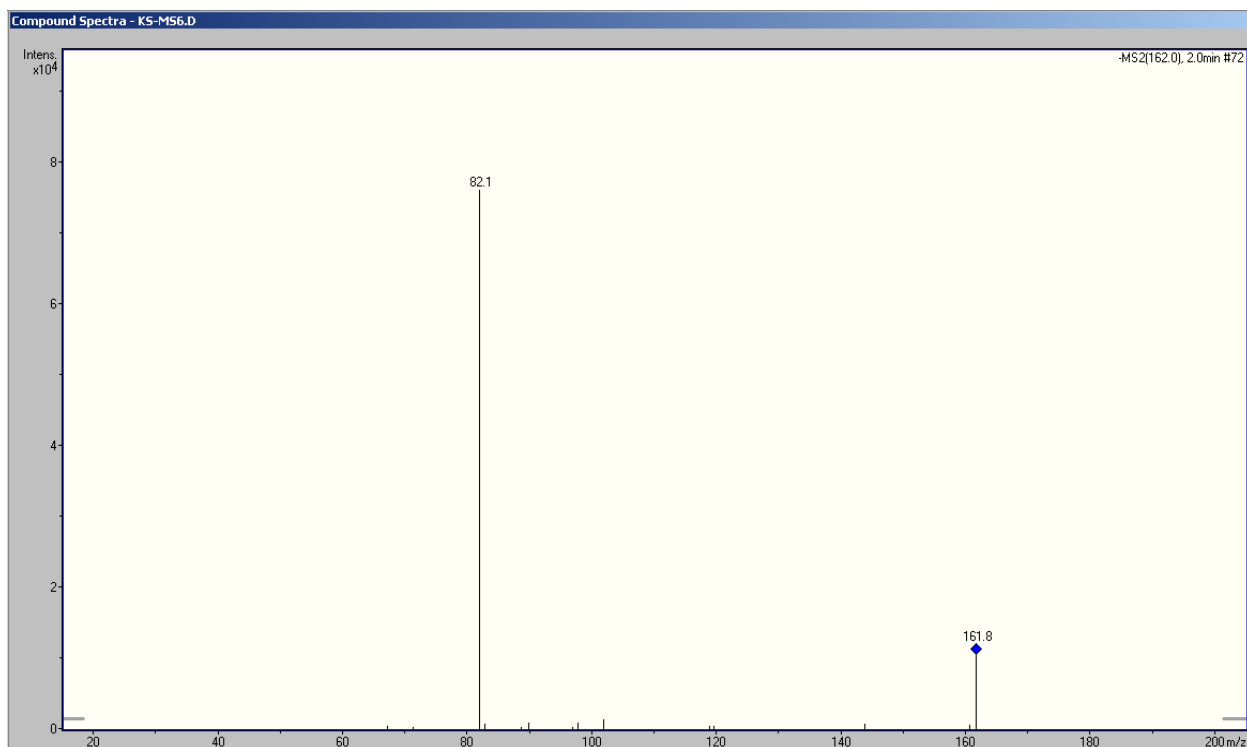


Obrázek 27: Ukázka chromatogramu – porovnání metod po úpravě parametrů, mobilní fáze methanol/Milli-Q voda okyselená HCOOH na pH 2-3

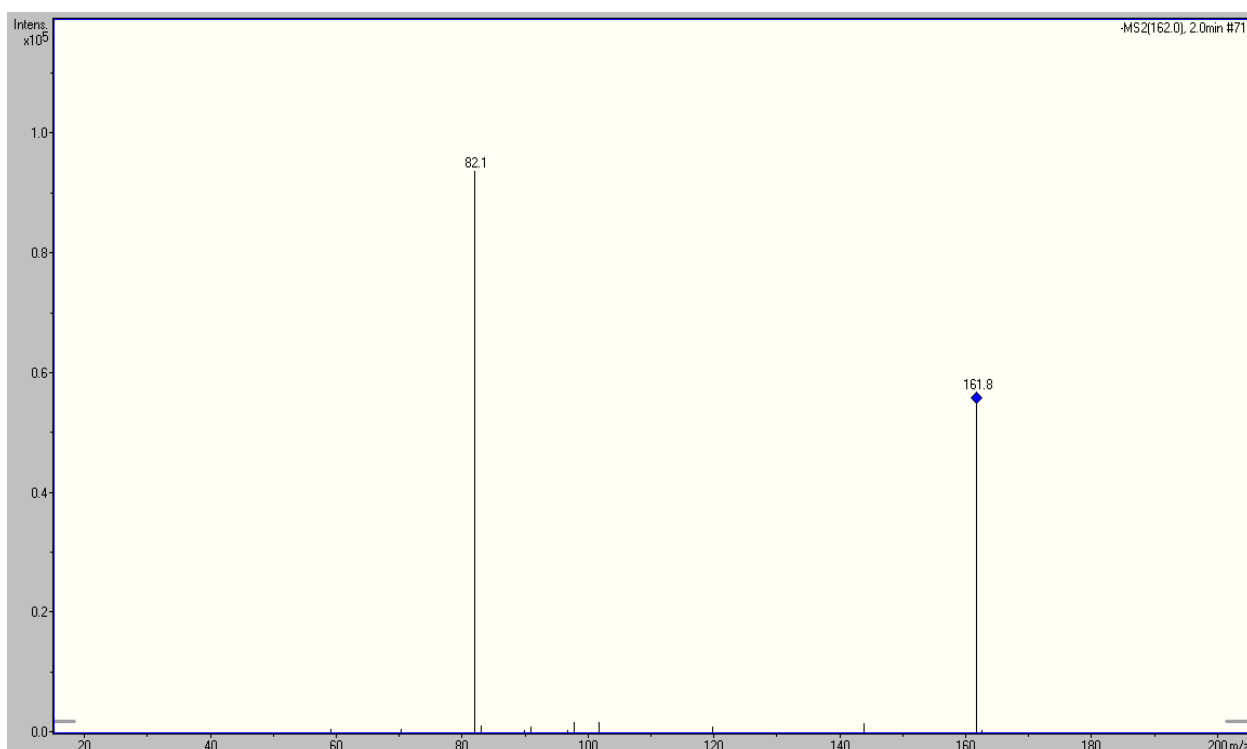


Obrázek 28: Ukázka chromatogramu s vyextrahovanými hmotami pro jednotlivé analyty – výsledná metoda

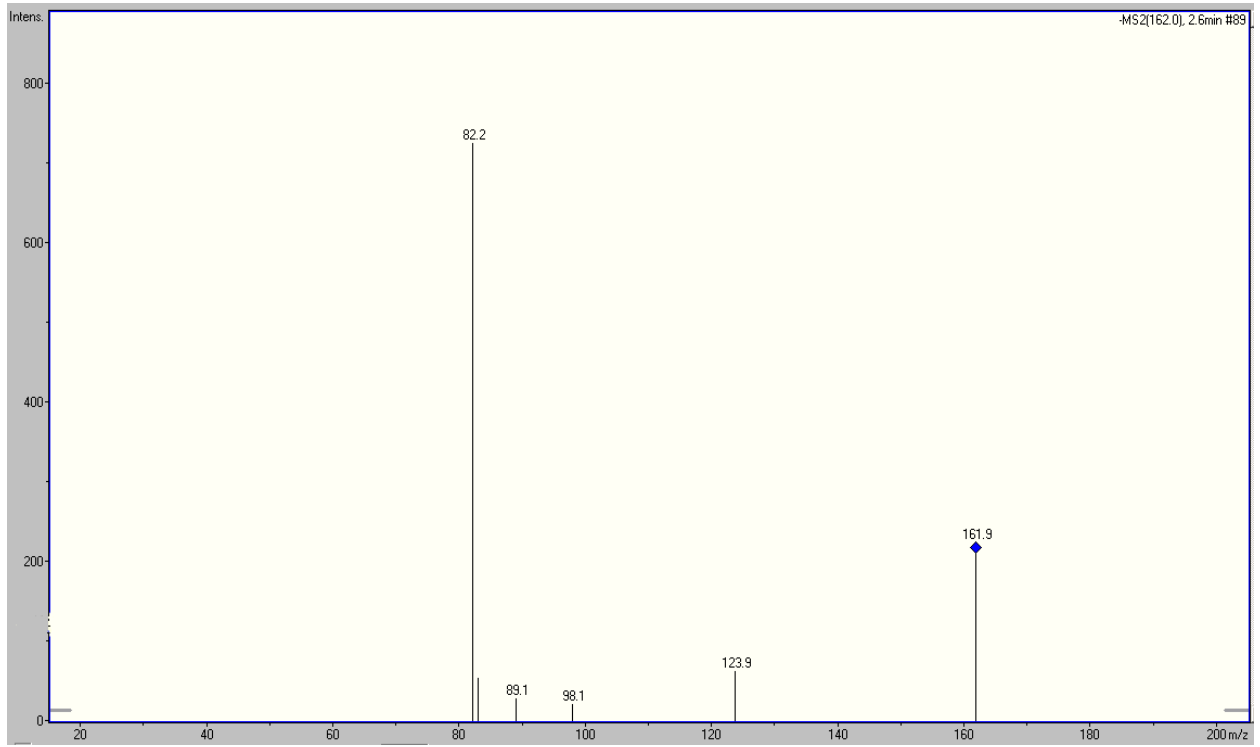
Příloha 2: Produktová spektra acesulfamu-K při optimalizaci LC/MS/MS za stejných podmínek



Obrázek 29: Produktové spektrum acesulfamu-K, 1



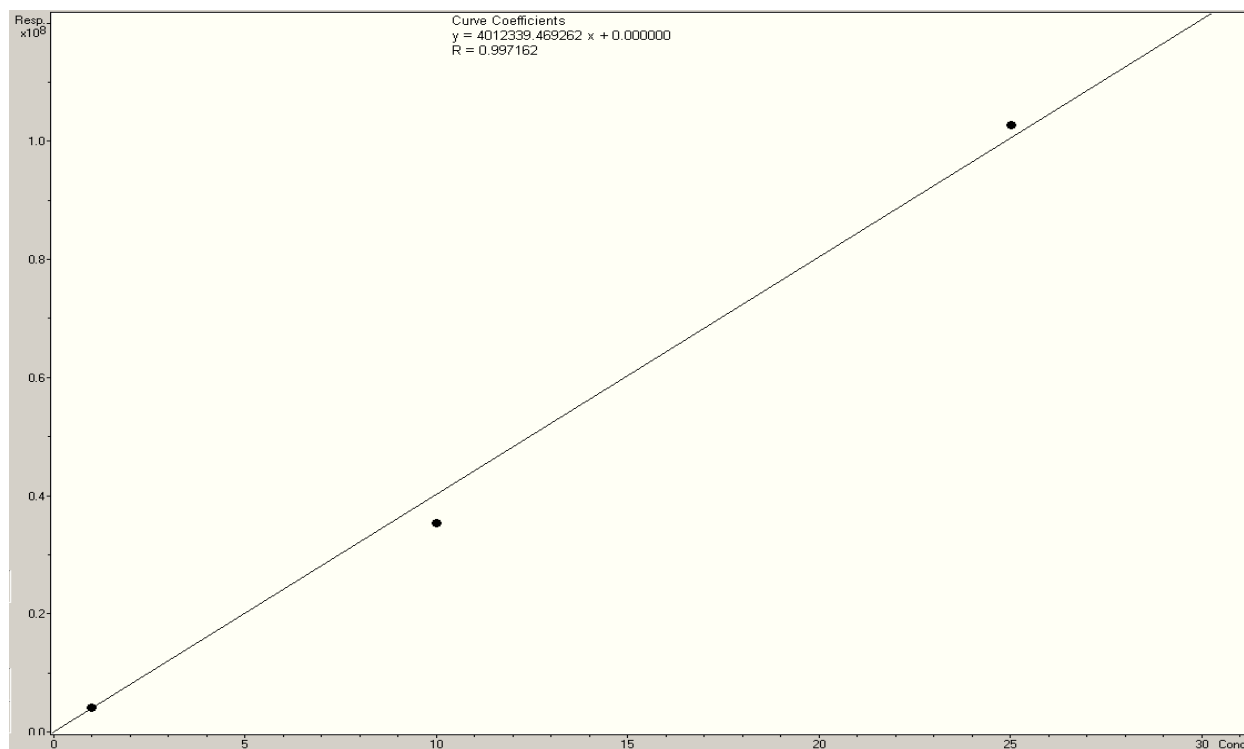
Obrázek 30: Produktové spektrum acesulfamu-K, 2



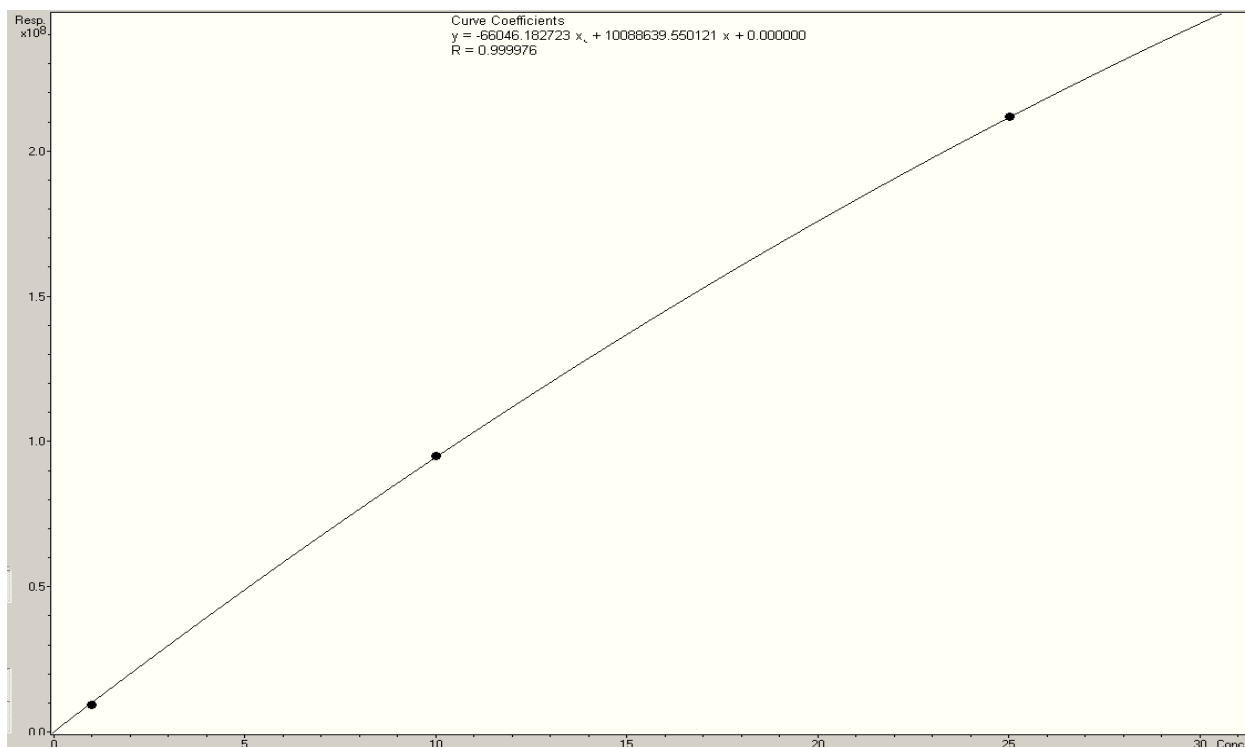
Obrázek 31: Produktové spektrum acesulfamu-K, 3

Příloha 3: Kalibrační závislosti – výtěžnost kolonky STRATA-X

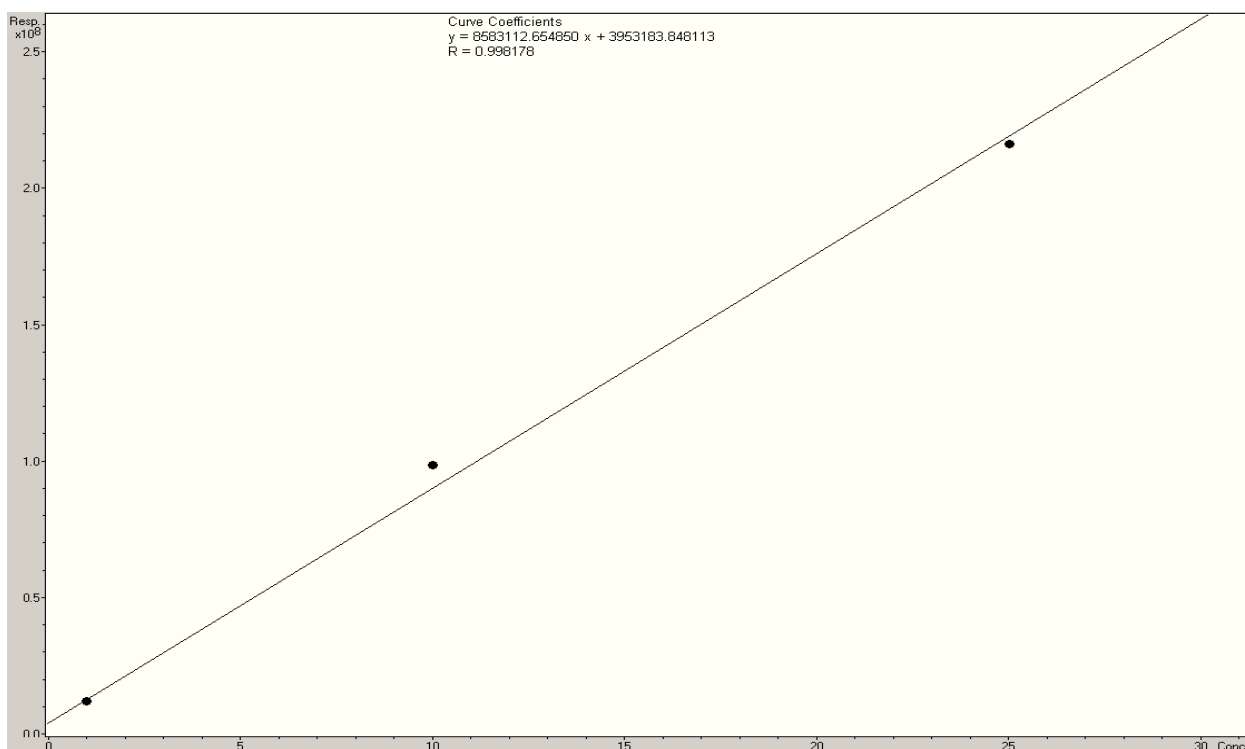
1. Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky po extrakci vzorku s koncentrací sladidel 10 µg/ml.



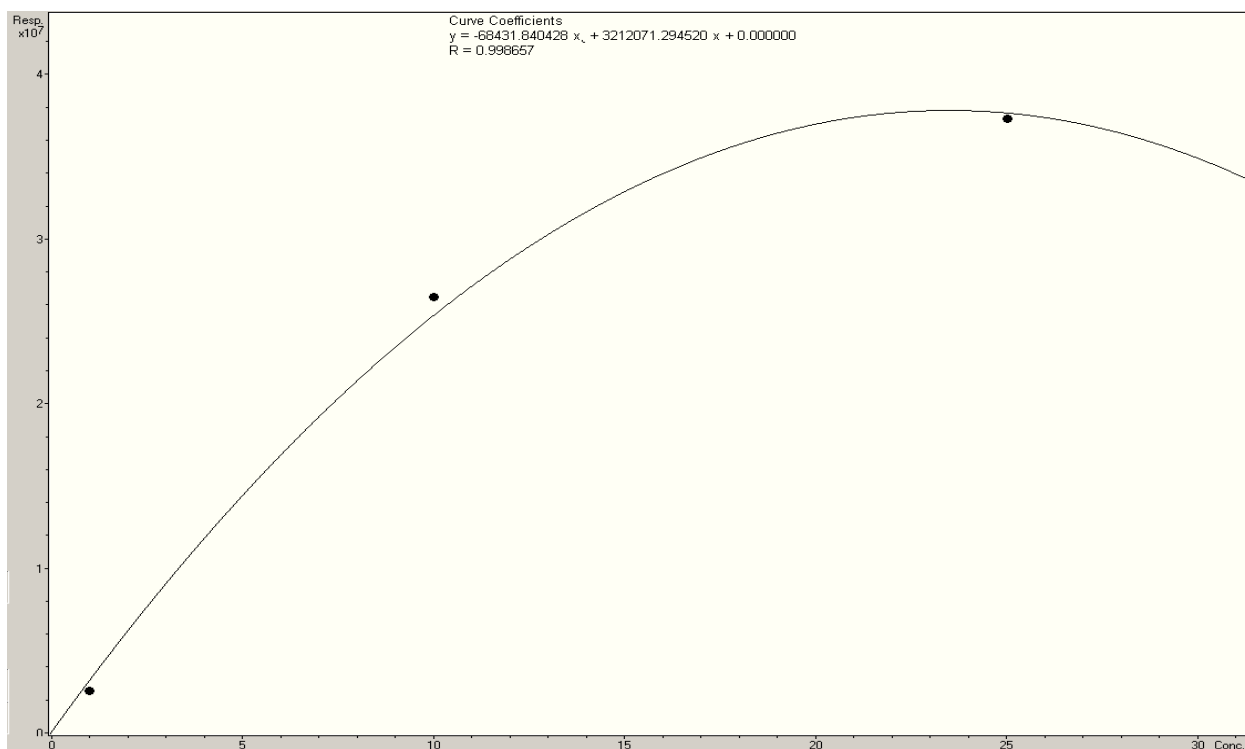
Obrázek 32: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – acesulfam-K, c = 10 µg/ml



Obrázek 33: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – cyklamát, $c = 10 \mu\text{g/ml}$

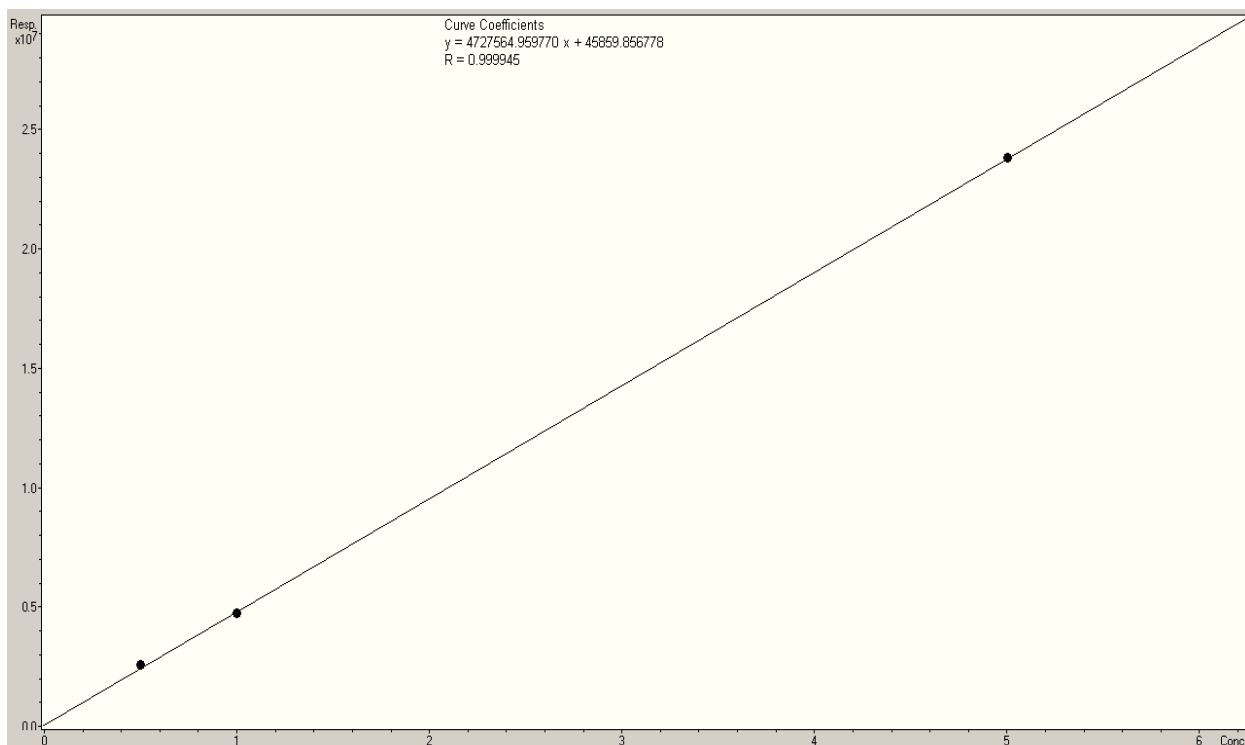


Obrázek 34: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – sacharin, $c = 10 \mu\text{g/ml}$

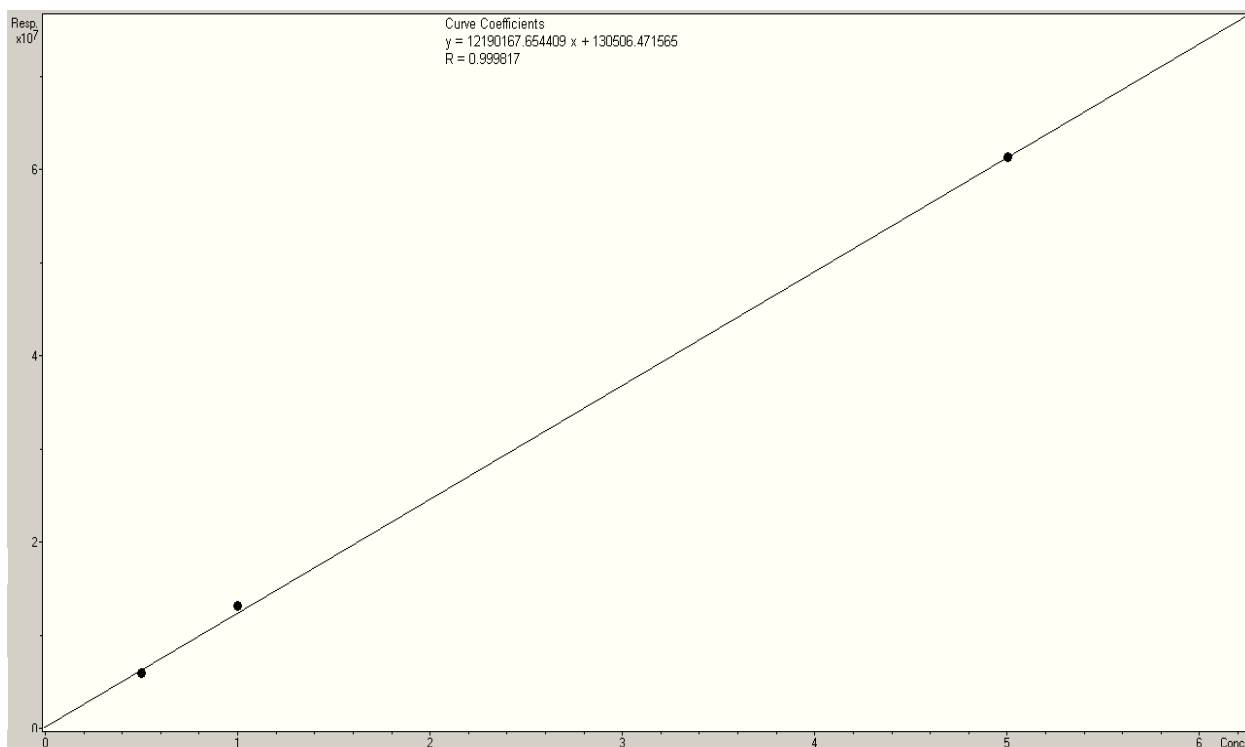


Obrázek 35: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – sukralosa, $c = 10 \mu\text{g/ml}$

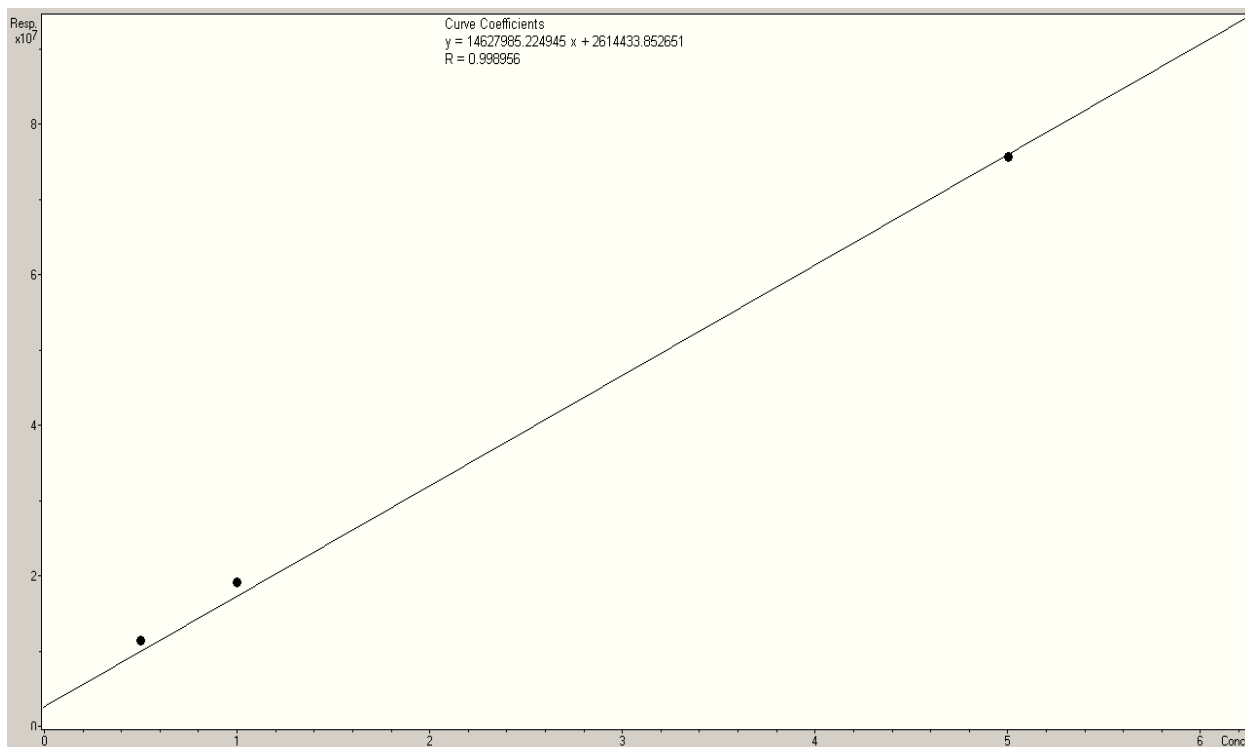
2. Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky po extrakci vzorku s koncentrací sladidel $1 \mu\text{g/ml}$.



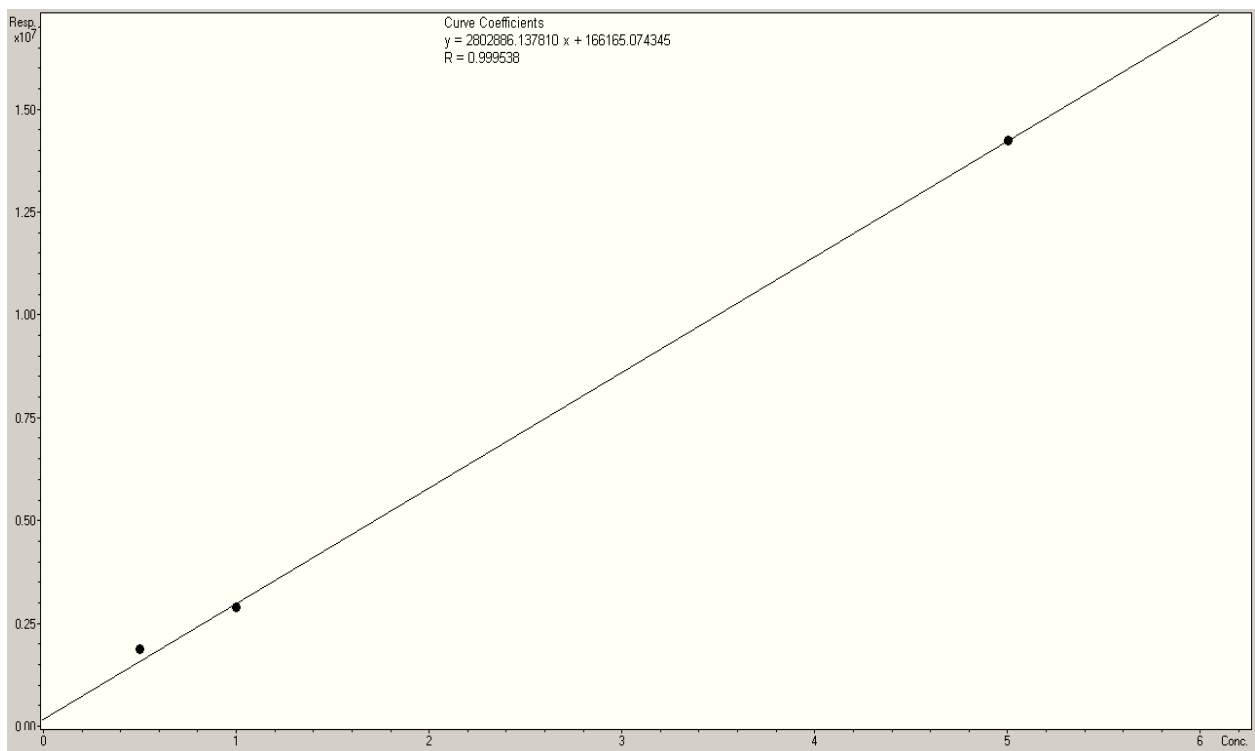
Obrázek 36: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – acesulfam-K, $c = 1 \mu\text{g/ml}$



Obrázek 37: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – cyklamát, $c = 1 \mu\text{g/ml}$

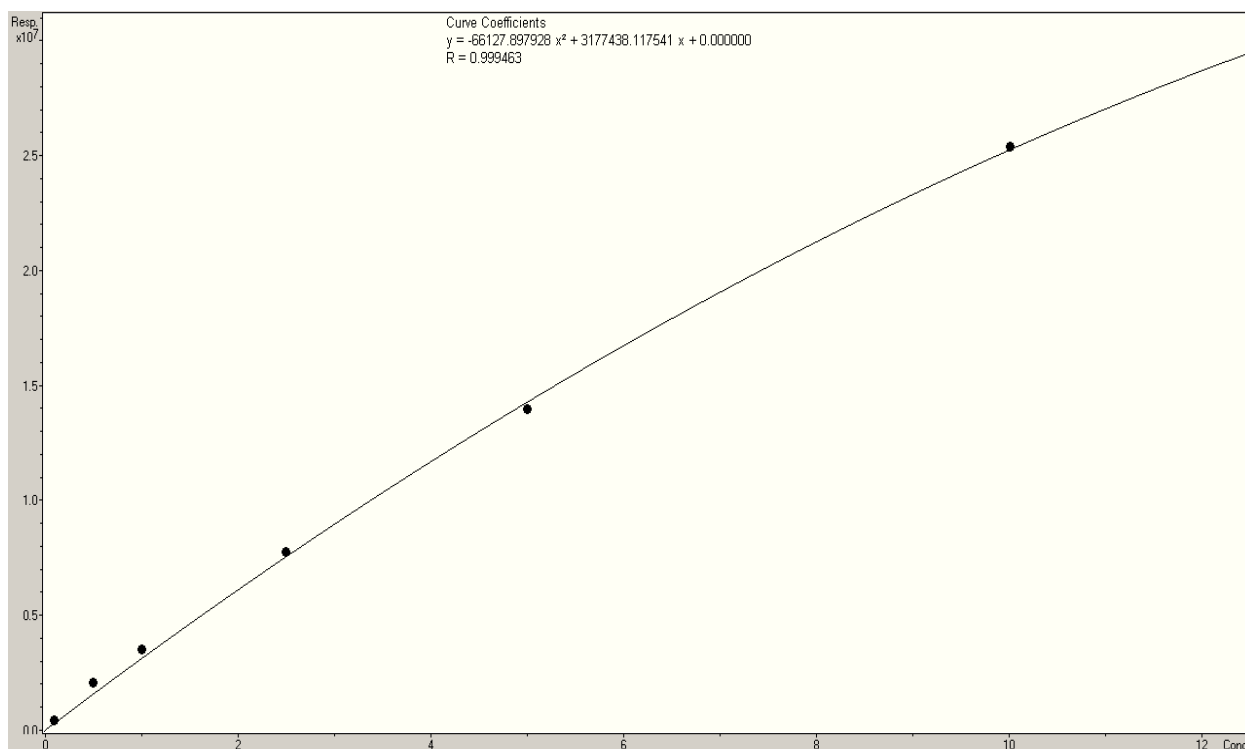


Obrázek 38: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – sacharin, $c = 1 \mu\text{g/ml}$

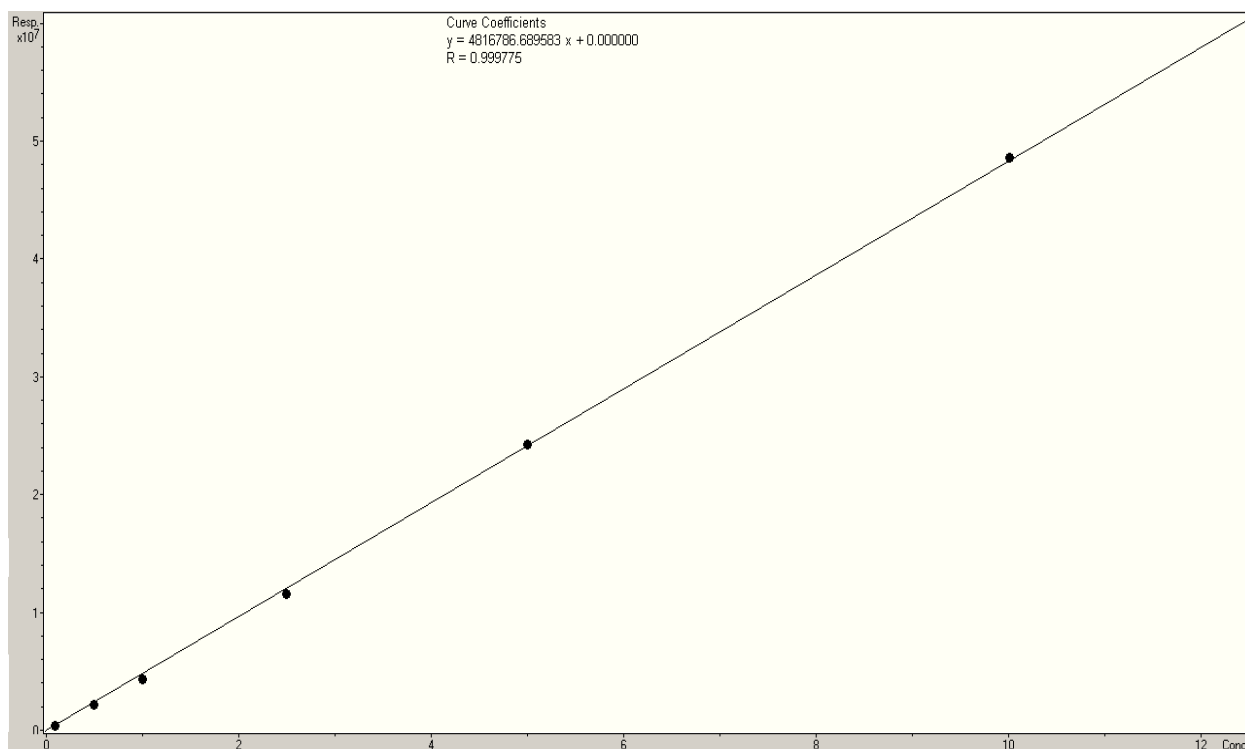


Obrázek 39: Kalibrační závislost pro hodnocení výtěžnosti kolonky – sukralosa, c = 1 µg/ml

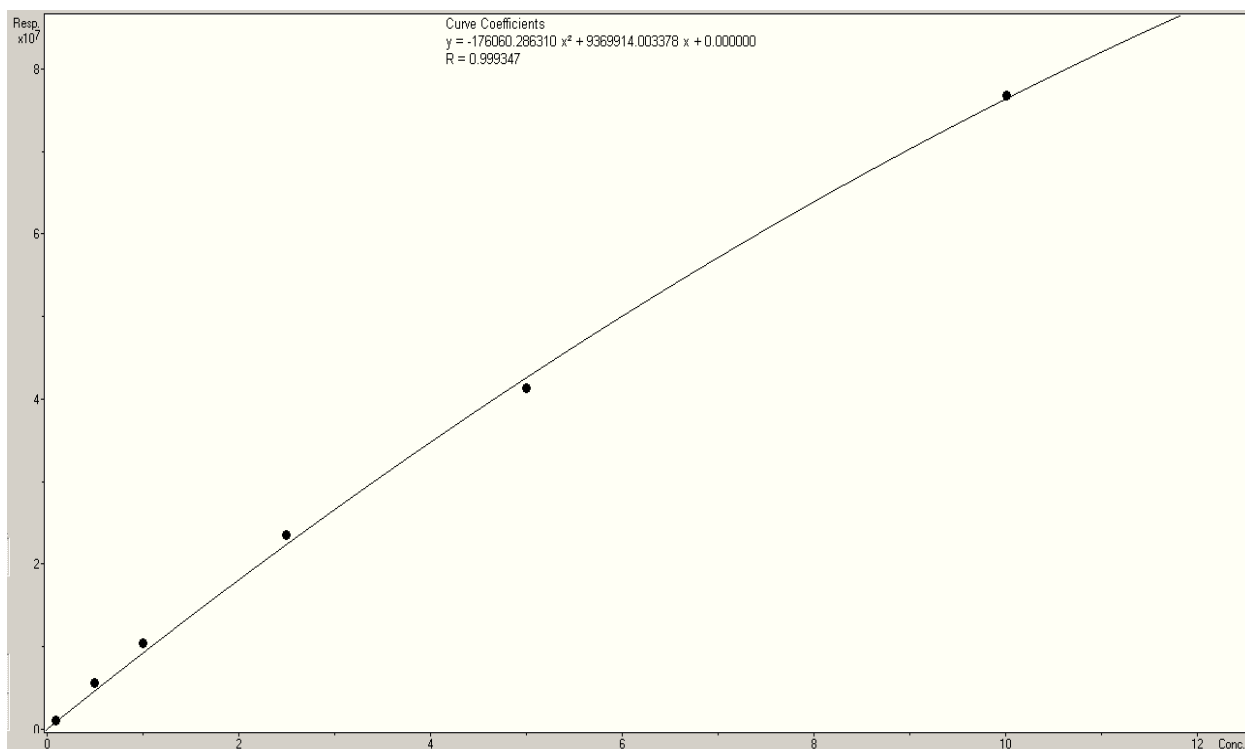
Příloha 4: Kalibrační závislosti - přítok



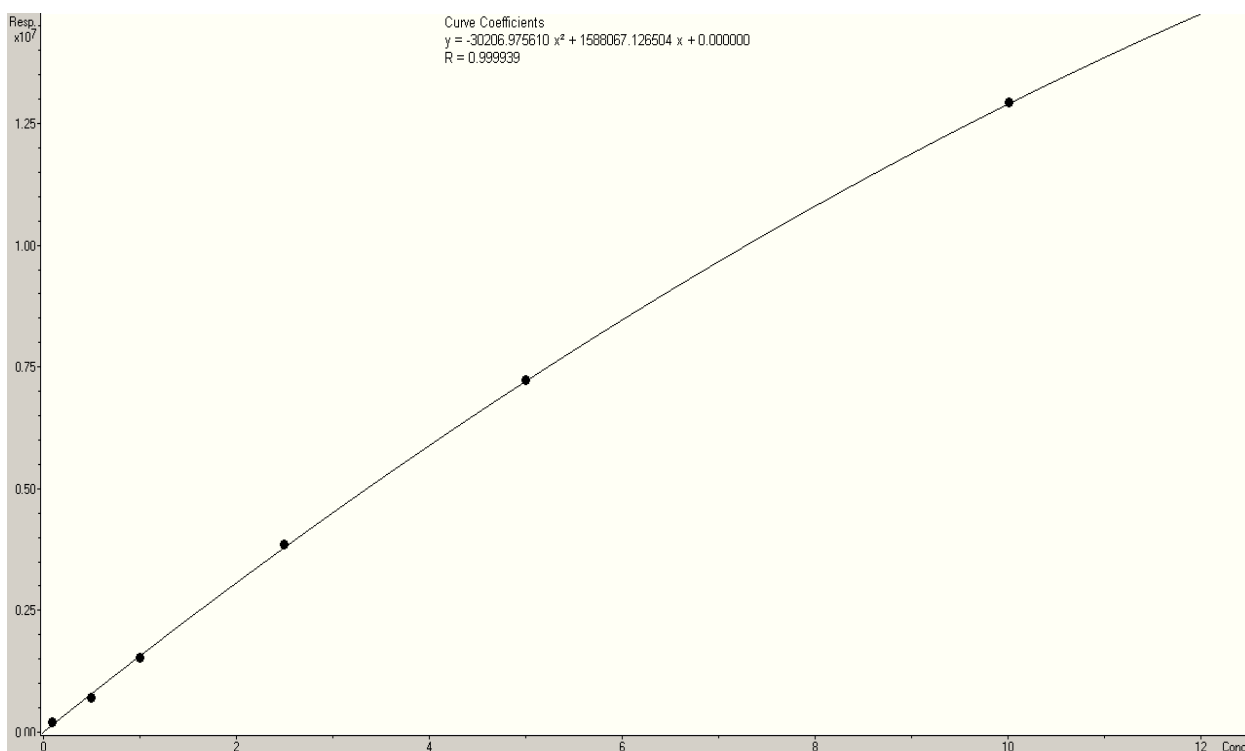
Obrázek 40: Kalibrační závislost – přítok, acesulfam-K



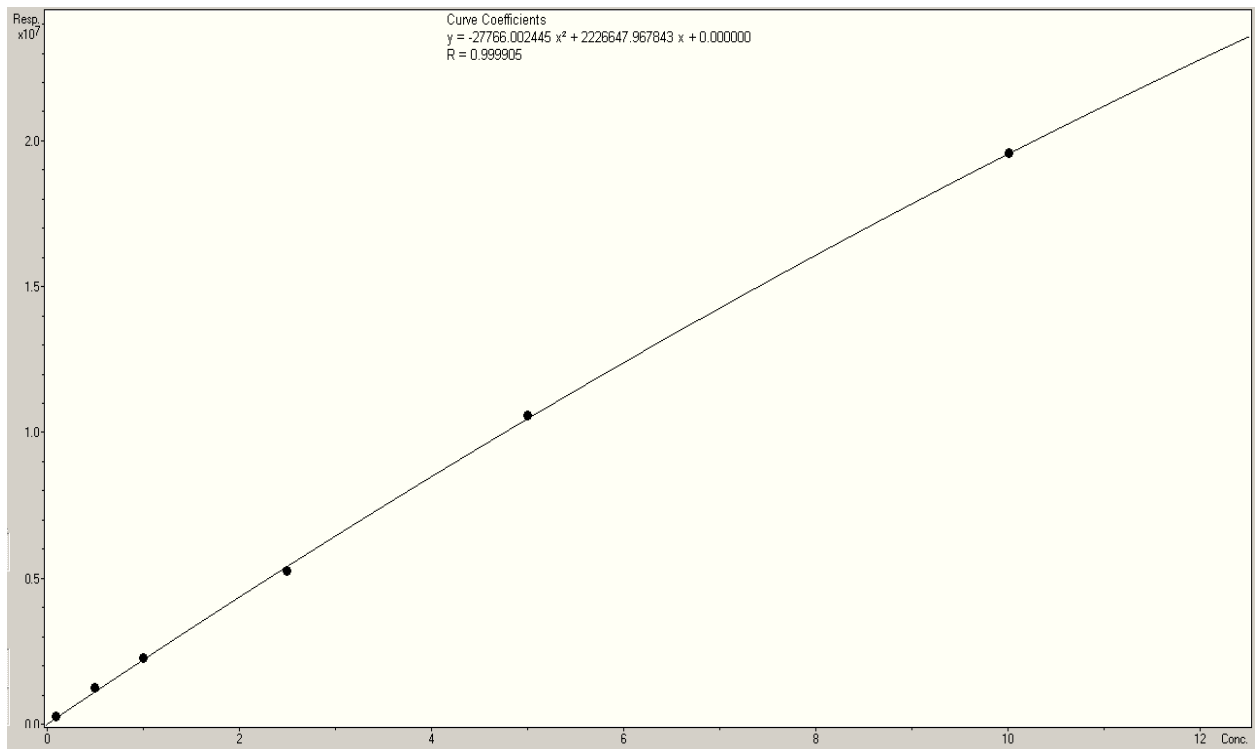
Obrázek 41: Kalibrační závislost – přítok, cyklamát



Obrázek 42: Kalibrační závislost – přítok, sacharin

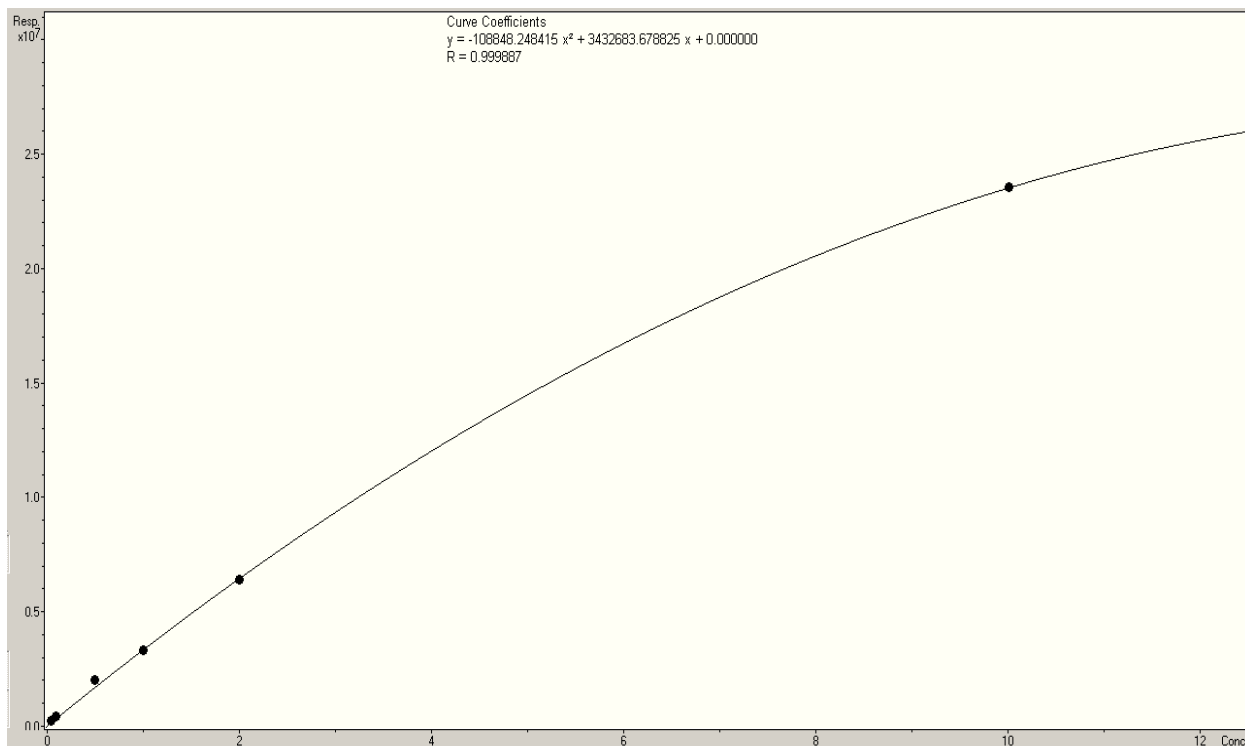


Obrázek 43: Kalibrační závislost – přítok, sukralosa

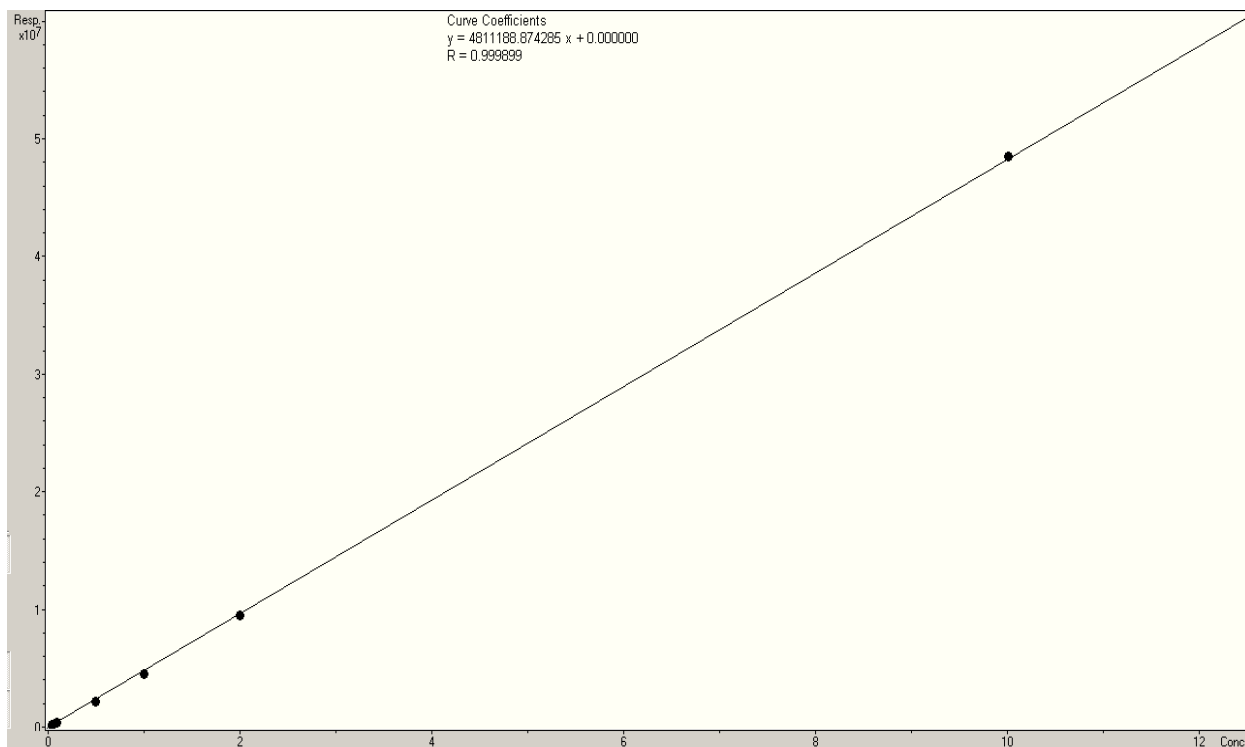


Obrázek 44: Kalibrační závislost – přítok, sukralosa-d6

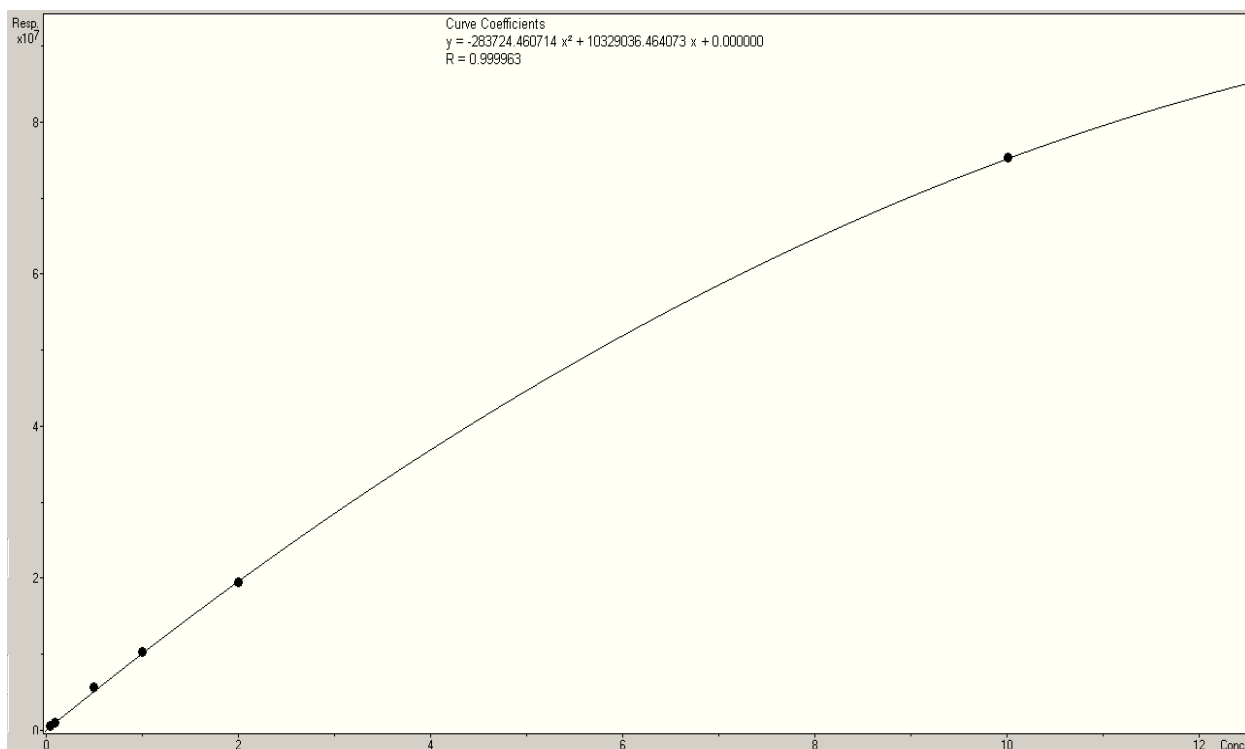
Příloha 5: Kalibrační závislosti – odtok



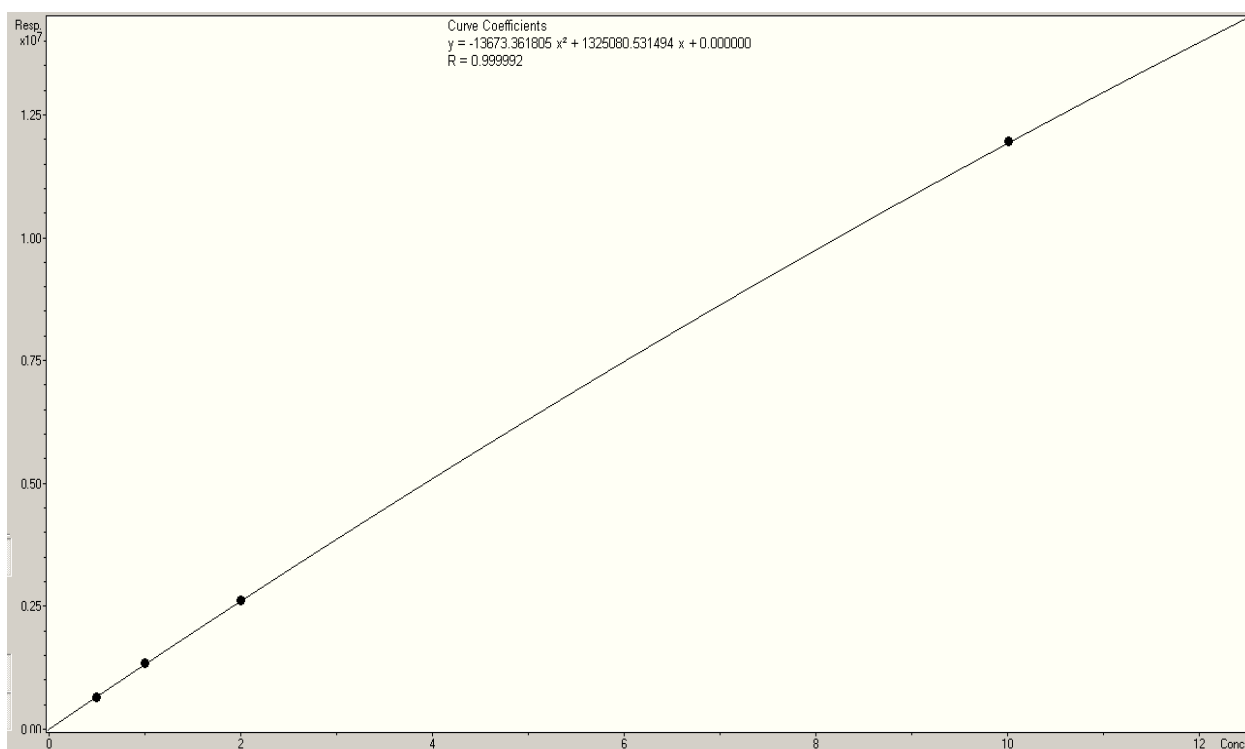
Obrázek 45: Kalibrační závislost – odtok, acesulfam-K



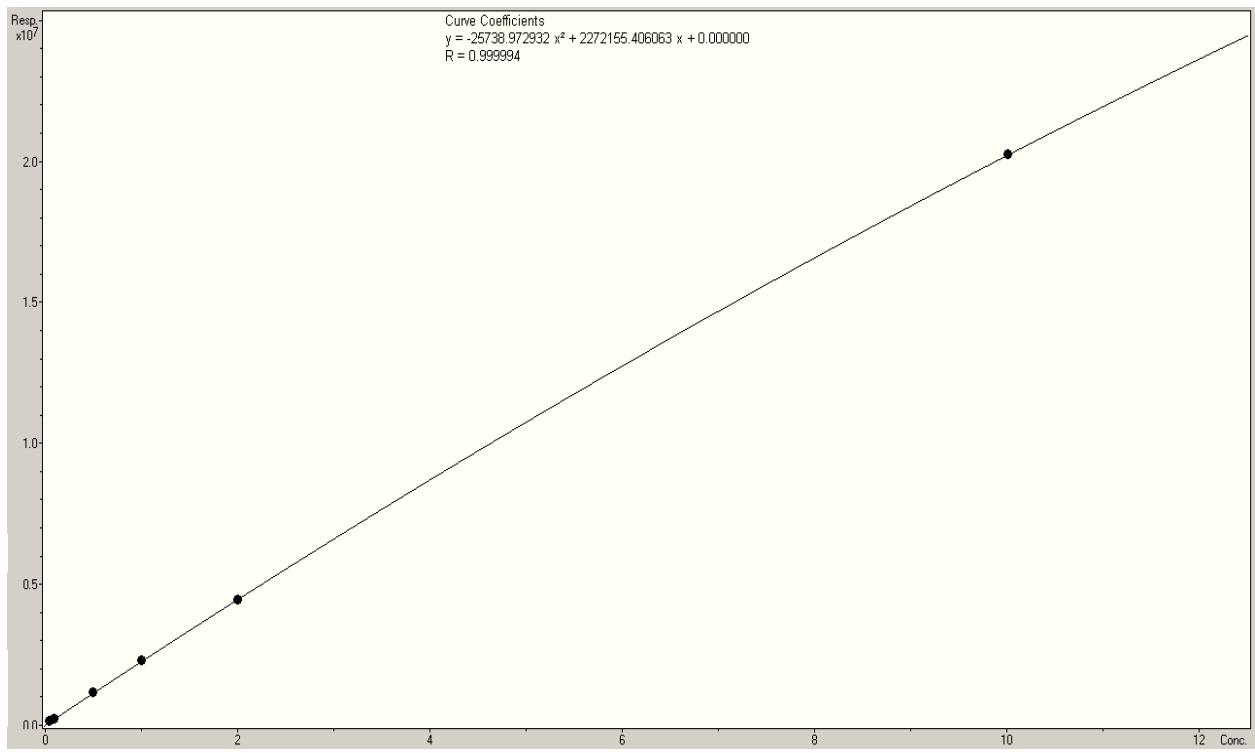
Obrázek 46: Kalibrační závislost – odtok, cyklamát



Obrázek 47: Kalibrační závislost – odtok, sacharin



Obrázek 48: Kalibrační závislost – odtok, sukralosa



Obrázek 49: Kalibrační závislost – odtok, sukralosa-d6

Příloha 5: Převedení úmrtnostních dat v procentech na probity [96]

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878