

DETEKCE PŘÍDATNÝCH LÁTEK V POTRAVINÁCH ADDITIVES DETECTION IN FOODSTUFF

Matej Pospiech, Bohuslava Tremlová, Slavomír Marcinčák

Abstract: Article summarized basic knowledge about food additives with an impact on people's health and mentioned the determination methods used for in different kinds of foods (beverages, confectionery). Consequently the article discusses the Sunset yellow, Quinoline yellow SS, Azorubine, Allura Red, Tartrazine and Ponceau 4R synthetic dyes which can cause hyperactivity in children. It also deals with the artificial sweetener Aspartame, which is not suitable for people with phenylketonuria. From artificial sweeteners are also mentioned polyol sugars Sorbitol, Mannitol, Isomalt, Maltitol, Lactitol and Xylitol. In conclusion, there are recommended detection methods.

Key words: HPLC, CZE, ketonuria, ADHD syndrome, alcohol sugar

ÚVOD

Potravinové přídatné látky (PPL) jsou v současnosti běžnou složkou potravin. Důvody jejich použití jsou různorodé, pokud pomineme případné falšování, využívají se na zlepšení vlastností potravin, zlepšení zpracování potravin a dále na zlepšení technologie výroby a balení. Pro zlepšení vlastností potravin se používají zejména sladidla, barviva a látky zvýrazňující chuť a vůni. Tyto PPL ovlivňují senzorycké vlastnosti, ale nesmíme zapomenout také na želírující látky, modifikované škroby, zahušťovadla, emulgátory, stabilizátory, plnidla, tavící soli a kypřící látky, které mají vliv také na senzorycké vlastnosti a to zejména vlastnosti texturní. Pro zlepšení zpracování potravin a dále na zlepšení technologie výroby a balení se využívají zejména PPL s funkčních skupin nosiče, protispěkové látky, odpeňovače, zpevňující látky, lešticí látky, zvlhčující látky, balící plyny, propelanty a látky zlepšující mouku. Kromě těchto samostatných skupin mohou mít vliv na technologii výroby také další PPL s jiných funkčních skupin. Rozdělení funkčních skupin je uvedeno v nařízení č. 1333/2008 (Nařízení, 2008). Příkladem mohou být škroby využívané na omezení lepivosti u některých cukrovinek.

Význam PPL v potravinách však zasahuje také do oblasti bezpečnosti a údržnosti potravin. Obě tyto oblasti jsou úzce propojené a budou proto zmíněny společně. Jedna s významných rolí, potravinových přídatných látek, je omezit mikrobiální riziko. Růst mikroorganismů mohou PPL potlačit nebo zastavit různými mechanismy. Zejména se jedná o PPL z funkčních skupin konzervantů, kyselin a balících plynů. Přídavek PPL však může omezit také riziko chemické. Zejména pokud toto riziko vzniká až v průběhu skladování potravin. Patří sem funkční skupiny antioxidanty a sekvestrany, které brání oxidaci tuků, ale můžeme sem zařadit také regulátory kyselosti, které udržují stabilní pH ve výrobku čím mohou zamezit fyzikálně chemickým změnám na použitých surovinách.

Důvody používání PPL jsou tedy zřejmé, ale nesmíme opomenout také fakt, že některé z PPL mohou v případě neřízeného příjmu způsobovat také zdravotní problémy. Některá barviva mohou u dětí vyvolávat hyperaktivitu. Jedná se o Žluť SY (E 110), Chinolinová žluť SY (E 104), Azorubin (E 122), Červeně allura (E 129), Tartrazin (E 102), Ponceau 4R (E 124). Z povolených sladidel je rizikový Aspartam, který může vyvolat zdravotní problémy u lidí trpících fenylketonurií a dále také skupina polyalkoholových cukrů Sorbitol (E 420), Mannitol (E 421), Isomalt (E 953), Maltitol (E 965), Laktitol (E 966) nebo Xylitol (E 967) kterých nadměrná konzumace může mít projímavé účinky.

Aby byla rizika z nadměrné míry konzumace co nejvíce minimalizována, věnují se bezpečnosti PPL různé mezinárodní a národní zdravotnické organizace, zejména se jedná o světové FAO/WHO, které vypracovaly všeobecnou normu pro potravinářské přídatné látky

(General Standard for Food Additives – GSFA). S pohledu EU se o bezpečnost stará Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). Jedna s důležitých podmínek použití PPL je také omezení jejich použití pouze na PPL které byly schválené pro použití v potravinách. Toto povolení musí vyplývat s posouzení bezpečnosti EFSA podle nařízení EU č. 1333/2008 a č. 1129/2011. (Nařízení 2008, 2011). Rovněž v případě použití PPL v potravinách, platí podmínky pro jejich správné označení, které vyplývá z nařízení EU č. 1333/2008 (Nařízení 2011). Protože jsou PPL látky látkami cizorodými platí pro jejich použití také omezení pro konkrétní potraviny, omezení pro jejich maximální množství je uvedeno ve stejném nařízení. V případě, že minimální množství není uvedeno, platí pravidlo pro jejich použití v minimálním nevyhnutelném množství (*quantum satis*).

Z důvodu, že je problematika PPL značně rozsáhlá je cílem tohoto příspěvku poskytnout přehled o detekčních metodách pro průkaz PPL u kterých je vysloveno omezení z důvodu jejich negativního vlivu na zdravotní stav spotřebitele.

BARVIVA

Asi nejznámější PPL, které mohou ovlivnit zdraví spotřebitele, jsou barviva. U některých potravinových barviv je popsán jejich vliv na aktivitu dětí (ADHD syndrom, porucha pozornosti s hyperaktivitou). První studie v této oblasti byla popsána už v roce 1975 (Feingold, 1975). Další významnou publikací ze současného období je studie Schab and Trinh (2004). Ve studii McCann (2007) a Bateman (2004) byl prokázán vliv syntetických barviv také ve spojitosti s konzervantem benzoanem sodným na hyperaktivitu dětí. Ve studii byly prokázány rozdíly podle věkové kategorie (3roční, 8/9 leté děti) a také individuální rozdíly mezi jedinci. Vliv sociální a demografický nebyl prokázán. Bateman (2004) také uvádí, že hyperaktivita byla popsána pouze rodiči, při klinickém vyšetření prokázána nebyla. Zmiňována je také možnost způsobovat alergické reakce (Eigenmann, 2004) přičemž jak uvádí autor, snaha rodičů o dietu bez umělých barviv byla ve většině případů nízká a nebylo možné ji ověřit.

Detekční metody pro stanovení Azorubinu jsou různorodé od „tradičních HPLC metod“ až po metody méně známe jako je elektroanalýza. Metoda kapalinové chromatografie s PAD detektorem byla ověřena na vínu s detekčním limitem 10 ppm (De Villiers et al., 2003) Autoři rovněž ověřovali metodu kapilární elektroforézy, kterou shledali jako vhodnou alternativu zejména s ohledem na nižší spotřebu reagensů a rychlost analýzy. HPLC metoda s PAD detektorem byla také ověřena pro simultánní stanovení 40 syntetických barviv v nápojích a kandidech s detekčním limitem 0,03 a 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Kromě Azorubinu je možné stanovit také Ponceau 4R, Allura červeně, Chinolinovou žlutě, Žlutě SY a Tartrazin (Yoshioka and Ichihashi, 2007) jedná se tedy o všechny barviva schopné vyvolat ADHD syndrom. Stanovení pro více barviv bylo rovněž ověřeno pomocí HPLC s DAD detektorem. Analýza byla ověřena také na dalších barvivech s vlivem na ADHD, detekční limit byl stanoven na 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respektive 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ podle povahy potraviny (Bonan et al., 2013). Pro komplexní stanovení byla ověřena také spektrofotometrická UV-Vis metoda kterou lze považovat za screeningovou pro stanovení přídatku umělých barviv do šafránu (Zalacain et al., 2007). Metodou bylo možné detekovat všechny barviva schopné vyvolat ADHD syndrom. Mezi tyto metody patří metoda elektroanalýzy pomocí bizmutových elektrod schopná detekce také Ponceau 4R, a Allura červeně. Detekční limit metody byl stanoven na 100 ppm (Claux and Vittori, 2007). Pro stanovení Azorubinu byla rovněž ověřena metoda rozšířené povrchové ramanovského spektroskopie (SARS), s detekčním limitem 0,5-500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pro slazené nápoje. Výhodou metody je, že není potřebné vzorky před analýzou připravit a vyšetření pak trvá 35 minut (Peksa et al., 2015). Další ověřenou metodou, která je schopna stanovit kromě Azorubinu také Allura červenou a Ponceau 4R je metoda diferenční pulzní polarografie. Metoda byla ověřena

na nealkoholických nápojích. Detekční limit byl od 22 do 48 $\mu\text{g.l}^{-1}$ podle pozitivních elektrolytů (Cambeau et al., 2001).

UMĚLÁ SLADIDLA - ASPARTAM

Další PPL která může mít negativní dopad na zdraví spotřebitele je Aspartam. Toto vysoce sladivé sladidlo se totiž metabolizuje esterázami a peptidázami za vzniku aminokyseliny fenylalaninu, kyseliny aspartamové a malého množství metanolu. S ohledem na to že při běžné konzumaci Aspartamu se spotřebitelé blíží pouze 5-10 % akceptovatelného denního příjmu nepředstavují tyto metabolické produkty vážný problém pro zdravé jedince. Jak už ale bylo zmíněno je rizikem pro lidi trpící onemocněním polyketonurie nebo označované také fenylketonurií. Jedná se o dědičné onemocnění s poruchou metabolismu fenylalanínu. Také v této skupině jedinců jsou rozdíly podle toho, o jakou formu onemocnění se jedná. U heterozygotních jedinců je jenom snížená schopnost jater metabolizovat fenylalanin a hladina fenylalaninu je tedy v krevní plazmě jen mírně zvýšená (Butcho et al., 2002). U homozygotních jedinců je hladina fenylalaninu v plazmě zvýšená a podle vícero studií po jednorázovém podání potravin s obsahem Aspartamu nedochází k jejímu zvýšení (Caballero et al., 1968; Wolf-Novak et al., 1990; Mackey and Berlin, 1992). Omezení konzumace Aspartamu u této skupiny lidí je tedy zejména ve smyslu celkové diety s nízkým obsahem fenylalaninu nutné.

Detekci Aspartamu se věnuje také více studií, uplatnění nachází zejména použití HPLC. Metoda LC s UV detekcí byla ověřena na nealkoholických nápojích s ověřením detekce degradačního produktu po zahřátí aspartamu kyseliny 5-benzyl-3,6,dioxo-2-piperazineoctové (5BZ) (Tsang et al., 1985). Podobná studie detekce Aspartamu a jeho metabolitů byla popsána také pro HPLC s MS detektorem s detekčním limitem 400ng (Gibbs et al., 1996). Metoda HPLC s fotochemickým reaktorem a elektrochemickým detektorem byla také ověřena u kolových nápojích a farmaceutických produktech s detekčním limitem 0,5 mg.l^{-1} (Galletti and Bocchini, 1996). S ohledem na rizikovost zejména degradačního produktu fenylalaninu byly vyvinuty metody schopné detektovat simultánně Aspartam a fenylalanin. Rovněž metoda HPLC s DAD detektorem byla ověřena pro detekci Aspartamu a jeho degradačního produktu 5BZ s detekčním limitem 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro 5BZ a 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pro Aspartam (Conceição et al., 2005). Pro simultánní detekci byly ověřeny metody HPLC detekce se spektrofotometrickou detekcí s detekčním limitem pro 0,06 mg.l^{-1} pro Aspartam a 0,01 mg.l^{-1} pro fenylalanin (Wróbel and Wróbel, 1997). Další možností je stanovení více sladidel v simultánním vyšetření. Výhodou je tedy, že lze prokázat průkaz použití také další sladidel. Ověřenou metodou je také iontová chromatografie s kondukčním detektorem, která detekuje také Cyklamát sodný, Acesulfat-K a Sacharin. Detekční limit pro Aspartam byl stanoven na 0,87 mg.l^{-1} (Zhu et al., 2005). Metodou založenou na HPLC s detektorem ELSD byl detekční limit pro aspartam stanoven na 13 $\mu\text{g/g}$ (Wasik et al., 2007). Metoda založená na HPLC s ESI-MS detektorem (elektronsprejovo ionizační s hmotnostním spektrometrickým detektorem) bylo kromě umělých sladidel možné stanovit přírodní steviosidy. Detekční limit byl stanoven pod 0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Yang and Chen, 2009). Z dalších simultánních metod stojí za zmínku také metody, které jsou schopny detekovat také další PPL případně další složky potravin. Simultánní metoda pro stanovení Aspartamu a dalších sladidel včetně, konzervantů, kofeinu, theobrominu a teofylinu byla popsána v práci Chen and Wang (2001). Metoda je založená na principu iontové chromatografie.

UMĚLÁ SLADIDLA - POLYALKOHOLOVÉ SACHARIDY

Poslední skupinou PPL, které mohou mít, negativní dopad na spotřebitele jsou polyalkoholové sacharidy. Můžeme je rozdělit na monosacharidové polyoly (Sorbitol, Manitol, Xylitol, Erythritol) a disacharidové polyoly (Lactitol, Isomalt, Maltitol). Jedná se o

nízko energetická sladidla, které pochází s některých rostlin nebo organismů. Jejich metabolismus je souběžný s metabolismem sacharidů a v případě středního příjmu dochází k jeho metabolismu zejména v játrech za vzniku glykogenu. V případě vysokého příjmu však už dochází k gastrointestinálním poruchám. Přičemž vznik potíží závisí od daného cukru a je řazen sestupně Manitol – Sorbitol - Xylitol. Jedná se zejména o průjem způsobený osmotickým tlakem. Jak už bylo zmíněno, pro vznik průjmu jsou potřebné vyšší dávky a v případě běžné konzumace např. ze žvýkaček nevede k vzniku příznaků (Mäkinen, 1984, Moskowitz, 1991).

Z detekčních metod, které se používají pro jejich stanovení, stojí za zmínku HPLC s nepřímým fotometrickým detektorem schopná stanovit Xylitol, Manitol a také Sorbitol. Detekční limit byl stanoven na 3,6 g.l⁻¹ pro Xylitol, 1,6 g.l⁻¹ pro Manitol, a 1,05 g.l⁻¹ pro Sorbitol (Dona and Verchère, 1994). Pro stanovení Xylitolu, Sorbitolu a Manitolu byla rovněž vyvinuta metoda zónové elektroforézy (CZE) s UV detektorem (Corradini et al., 1998). CZE s UV detektorem byla také ověřena v práci Pospisilova et al., (2007). Detekční limit pro metodu byl stanoven na 30 ug.ml⁻¹. CZE s ILIF (nepřímý laserem indukovaný fluorescenční detektor) a IUV (nepřímí UV detektor) detektory byly rovněž ověřeny pro stanovení monosacharidových polyolů s detekčním limitem 19,0-24,4 ug.ml⁻¹ (Xiao et al., 2015). Simultánní detekce polyalkoholických sladidel ale také nepolyalkoholových sladidel Acesulfamu K, Sacharinu, Aspartamu, Cyklamátu a Sorbitolu byla ověřena pomocí isotachoforézy. S detekčním limitem v rozmezí 0,024-0,081 mM (Hermannová et al., 2006). Pro souběžné stanovení polyalkoholických sladidel s mono a disacharidy byla ověřena metoda ionová chromatografie s puzlím ampermetrickým detektorem (HPAEC-PAD) s detekčním limitem 1-4 mg.l⁻¹ (Andersen and Sørensen, 2000). HPAEC-PAD byla ověřena také studií Corradini et al. (1997) na stanovení Sorbitolu, Manitolu ale také přírodního sladidla fruktózy. Detekční limit byl stanoven na 2 ng pro Xylitol a Manitol a 3 ng pro Sorbitol. Metoda HPLC-MS-MS byla ověřena také pro stanovení Manitolu, Xylitolu, Sorbitolu ale také pro stanovení disacharidu maltózy. Detekční limit byl stanoven na 0,1 mg.kg⁻¹ maltózy (MA et al., 2011).

ZÁVĚR

Přídavné potravinové látky mají pro používání svoje důvody. Výroba bez jejich použití je v současné době (moderní pohled na výrobu a skladovací nároky) v podstatě nemožná. Při používání PPL však nesmíme zapomenout, že některé PPL mohou mít také negativní dopad na spotřebitele. U potravinových barviv je nejvíce diskutován vznik tzv. ADHD syndromu. Výsledky však nejsou jednoznačné. V rámci existujících detekčních metod pro barviva jsou nejrozšířenější metody HPLC. Pro použití v praxi lze jednoznačně doporučit metody simultánní, které mohou stanovit celou řadu potravinových barviv v jednom vyšetření. Dalším PPL s dopadem na zdraví spotřebitele je umělé sladidlo Aspartam, které zejména u lidí, trpících polyketonurií může způsobit zvýšení hladiny fenylalaninu v krevní plazmě. Nicméně podle vícerých studií nevede vyloučení aspartamu ve stravě k významnému snížení hladiny fenylalaninu v plazmě. Pro detekci jsou nejrozšířenější metody HPLC. Jako vhodné metody pro stanovení s ohledem na snížení obsahu fenylalaninu v dietě lze jednoznačně doporučit metody se simultánním průkazem fenylalaninu. Další skupina PPL majících vliv na spotřebitele jsou polyalkoholické cukry. Při běžné konzumaci jsou však metabolizovány stejně jako sacharidy. Teprve jejich vysoký příjem může způsobit osmotický průjem. Pro detekci těchto PPL jsou nejvhodnější metody kapilární elektroforézy. Stejně jako u barviv existují také simultánní detekční metody schopné stanovit více polyalkoholických cukrů, které lze pro využití v praxi doporučit.

LITERATURA

- Andersen, Rikke, Sørensen, Annemarie. 2000. Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 897.1: 195-204.
- Bateman, Belinda, et al. 2004. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*, 89.6: 506-511.
- Bonan, Stefania, et al. 2013. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments*, 99.1: 36-40.
- Butchko, Harriett H., et al. 2002. Aspartame: review of safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35.2: S1-S93.
- Caballero, Benjamin, et al. 1986. Plasma amino acid levels after single-dose aspartame consumption in phenylketonuria, mild hyperphenylalaninemia, and heterozygous state for phenylketonuria. *The Journal of Pediatrics*, 109.4: 668-671.
- Claux, Benoît, Vittori, Olivier. 2007. Bismuth film electrode as an alternative for mercury electrodes: determination of azo dyes and application for detection in food stuffs. *Electroanalysis*, 19.21: 2243-2246.
- Combeau, S., Chatelut, M., Vittori, O. 2002. Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. *Talanta*, 56.1: 115-122.
- Conceição, Marta M., et al. 2005. Study of thermal degradation of aspartame and its products of conversion in sweetener using isothermal thermogravimetry and HPLC. *Thermochimica Acta*, 433.1: 163-169.
- Corradini, Claudio., et al. 1998. Improved method for the analysis of alditols in confectionery products by capillary zone electrophoresis (CZE): Comparison with high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Italian Journal of Food Science*, 10.3: 195-206.
- Corradini, Claudio, et al. 1997. Separation of alditols of interest in food products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 791.1: 343-349.
- De Villiers, André, et al. 2003. Evaluation of liquid chromatography and capillary electrophoresis for the elucidation of the artificial colorants brilliant blue and azorubine in red wines. *Chromatographia*, 58.7-8: 393-397.
- Dona, Anne-Marie, VERCHÈRE, Jean-François. 1995. High-performance liquid chromatography of alditols with indirect photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 689.1: 13-21.
- Eigenmann, Philippe A., Haenggeli, Charles A. 2004. Food colourings and preservatives—allergy and hyperactivity. *The Lancet*, 364.9437: 823-824.
- Feingold, Ben F. 1975. Hyperkinesis and learning disabilities linked to artificial food flavors and colors. *AJN The American Journal of Nursing*, 75.5: 797-803.
- Galletti, Guido C., Bocchini, Paola. 1996. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection of aspartame with a post-column photochemical reactor. *Journal of Chromatography A*, 729.1: 393-398.
- Gibbs, Bernard F., Alli, Intez, Mulligan, Catherine N. 1996. Simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its metabolites in foods. *Journal of Chromatography A*, 725.2: 372-377.
- Herrmannová, Michaela, et al. 2006. Direct simultaneous determination of eight sweeteners in foods by capillary isotachopheresis. *Journal of Separation Science*, 29.8: 1132-1137.
- Chen, Qing-Chuan, Wang, Jing. 2001. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937.1: 57-64.
- Ma, Shu-min, et al. 2011. Determination of mannitol, maltose, xylitol, sorbitol in foods by LC-MS/MS method [J]. *China Food Additives*, 5: 037.
- Mackey, Stephanie A. and Berlin C.M. 1992. Effect of dietary aspartame on plasma concentrations of phenylalanine and tyrosine in normal and homozygous phenylketonuric patients. *Clinical Pediatrics*, 31.7: 394-399.
- Mäkinen, K. K. 1983. Effect of long-term, peroral administration of sugar alcohols on man. *Swedish Dental Journal*, 8.3: 113-124.
- Mccann, Donna, et al. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 370.9598: 1560-1567.
- Moskowitz, A. 1991. Maltitol and hydrogenated starch hydrolysate. *Alternative Sweeteners*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie Text s významem pro EHP. Ú. v. EÚ L 295, 12.11.2011, s. 1 – 177.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Ú.v. *EÚL* 354, 2008, 31.12.2008, s. 16-33.

Peksa, Vlastimil, et al. 2015. Quantitative SERS analysis of azorubine (E 122) in sweet drinks. *Analytical Chemistry*, 87.5: 2840-2844.

Pospíšilová, Marie, et al. 2007. Determination of mannitol and sorbitol in infusion solutions by capillary zone electrophoresis using on-column complexation with borate and indirect spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1143.1: 258-263.

Schab, David W., Trinh, Nhi-Ha T. 2004. Do artificial food colors promote hyperactivity in children with hyperactive syndromes? A meta-analysis of double-blind placebo-controlled trials. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 25.6: 423-434.

Tsang, Wing Sum, Clarke, Margaret A., Parrish, Frederick W. 1985. Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33.4: 734-738.

Wasik, Andrzej, Mccourt, Josephine, Buchgraber, Manuela. 2007. Simultaneous determination of nine intense sweeteners in foodstuffs by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection—development and single-laboratory validation. *Journal of Chromatography A*, 1157.1: 187-196.

Wolf-Novak, Louise C., et al. 1990. Aspartame ingestion with and without carbohydrate in phenylketonuric and normal subjects: Effect on plasma concentrations of amino acids, glucose, and insulin. *Metabolism*, 39.4: 391-396.

Wróbel, Kazimierz, Wróbel, Katarzyna. 1997. Determination of aspartame and phenylalanine in diet soft drinks by high-performance liquid chromatography with direct spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 773.1: 163-168.

Xiao, Yao, et al. 2015. Determination of alditols by capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, 174: 233-239.

Yang, Da-Jin, Chen, Bo. 2009. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57.8: 3022-3027.

Yoshioka, N., Ichihashi, K. 2008. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. *Talanta*, 74.5: 1408-1413.

Zalacain, A., et al. 2005. Screening method for the detection of artificial colours in saffron using derivative UV-Vis spectrometry after precipitation of crocetin. *Food Additives and Contaminants*, 2005, 22.7: 607-615.

Zhu, Yan, et al. 2005. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1085.1: 143-146.

Kontakní adresa: MVDr. Matej Pospiech Ph.D., Fakulta veterinární hygieny a ekologie. VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno. E-mail: mpospiech@vfu.cz