

**SÄILITUSAINETE MÄÄRAMINE KARASTUSJOOKIDES KASUTADES  
HPLC JA SPEKTROFOTOMEETRIA MEETODIT**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Karina Nikolajeva

Juhendaja: Viia Lepane, dotsent, Keemia ja biotehnoloogia instituut

Õppekava: LAAB17/17

# Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Karina Nikolajeva

29.05.2023, allkirjastatud digitaalselt

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Viia Lepane

29.05.2023, allkirjastatud digitaalselt

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: [nimi]

[allkiri- ja kuupäev]

# Sisukord

Annotatsioon.....	5
Abstract .....	6
Lühendite loetelu .....	7
Sissejuhatus.....	8
1. Kirjanduse ülevaade .....	9
1.1 Toidu lisaainete süstemaatika .....	9
1.1.1 Lisaained.....	9
1.1.2 EL määrused .....	9
1.1.3 Säilitusained .....	10
1.2 Karastus- ja mahlajookide iseloomustus .....	11
1.2.1 Joogi morfoloogia.....	11
1.2.2 Karastusjoogid ja nende klassifikatsioon .....	11
1.2.3 Karastusjookide koostis.....	11
1.3 Säilitusained karastus-ja mahlajookides.....	13
1.3.1 Väaveldioksiid.....	13
1.3.2 Bensoehape ja bensoaadid .....	14
1.3.3 Sorbiinhape ja sorbaadid.....	16
1.4 Meetodid bensoaatide ja sorbaatide analüüsiks.....	18
1.4.1 HPLC .....	18
1.4.2 UV-VIS Spektrofotomeetria.....	20
2. Eksperimentaalne osa .....	22
2.1 Kasutatud säilitusainete iseloomustus .....	22
2.2. Uuritud joogid ja nende iseloomustus.....	23
2.3. Kasutatud reagendid ja aparatuur .....	23
2.4. Spektrofotomeetriline säilitusainete analüüs.....	24
2.4.1 Standardlahuste ettevalmistamine .....	24
2.4.2 Absorptsiooni mõõtmine .....	24
2.4.3 Proovide ettevalmistamine .....	25
2.4.4 Kalibreerimiskõverate joonistamine .....	25
2.5. Säilitusainete analüüs pööratud faasi HPLC meetodil .....	27
2.5.1 Analüüsitingimused.....	27
2.5.2 Eluendi valimine .....	27
2.5.3 Standardlahuste ettevalmistamine .....	27
2.5.4 Kalibreerimiskõverate joonistamine .....	27

2.5.5 Proovide ettevalmistamine .....	29
2.6 Katseandmete statistiline töötlus .....	30
3. Tulemused ja nende arutelu .....	30
3.1 Spektrofotomeetriliste tulemuste töötlemine .....	30
3.1.1 Kalibreerimiskõvera meetod .....	30
3.1.2 Teise arvutusmeetodi kasutamine .....	31
3.2 Kromatograafia tulemuste töötlemine .....	33
3.4 Varasemate uuringute tulemused .....	35
3.3 Hinnang kasutatud meetoditele ja võrdlus.....	36
4. Kokkuvõte.....	37
Tänuavaldused .....	38
Kasutatud kirjandus.....	39
Lisad.....	42
Lisa 1. Na-bensoaadi kromatogramm kasutades 70:30% v/v 0,1 M naatriumatsetaat:metanool eluent, detekteerimise lainepikkus 254 nm.....	42
Lisa 2. Kalibreerimiskõvera meetodi kontsentratsioonide arvutuste tabel.....	43
Lisa 3. Spektrofotomeetrilised arvutused, arvestades kahe komponendi spektrite kattumist... 44	44
Lisa 4. Kromatograafilise meetodi kontsentratsioonide arvutuste tabel .....	46

## Annotatsioon

Käesoleva töö eesmärgiks oli kahe enamkasutatava säilitusaine sisalduste kvantitatiivne määramine karastusjookides. Säilitusainetena uuriti bensoe- ja sorbiinhapet. Nende hapete vähese lahustuvuse tõttu vesilahustes kasutatakse nende leelismetallide soolaid ning eksperimentaalses osas teostati katsed naatriumbensoadi ja kaaliumsorbaadiga. Katseteks valiti viis erinevate tootjate karastusjooki: Kanes, Valge Klaar, Enjoy, Mountain Dew ja Active, millest kolm vastavalt etikettidele sisaldavad mõlemat säilitusainet ja kaks ainult sorbaati. Ainete kontsentratsiooni määramiseks kasutati kahte analüüsimeetodit – UV-Vis spektrofotomeetriat ja HPLC ehk pööratud faasi kõrgsurve vedelik-kromatograafiat. Mõlemat meetodit võrreldi omavahel ja hinnati nende sobivust säilitusainete analüüsiks.

UV-Vis spektrofotomeetrilise meetodi katsete käigus selgus, et andmete töötlemiseks ei sobi kalibreerimiskõvera meetod, kuna uuritud säilitusainete neeldumisspektrid kattuvad üksteisega. Seetõttu tuli teha lisaarvutusi, arvestades komponentide spektrite kattumist. Neeldumismaksimumid saadi 254 nm kaaliumsorbaadi ja 224 nm naatriumsorbaadi jaoks. Selle meetodi tulemused näitasid, et analüüsitud joogid sisaldavad bensoehapet vahemikus  $35,9 \pm 0,3$  mg/l -  $136,2 \pm 4,1$  mg/l ja sorbiinhapet  $146,7 \pm 0,2$  mg/l -  $187,6 \pm 0,2$  mg/l. Vastavalt tootja poolt märgitud teabele, peaks Kanes ja Mountain Dew sisaldama ainult kaaliumsorbaati, kuid kõigis jookides tuvastati mõlemat säilitusainet. Kuna Mountain Dew-s on bensoehappe kontsentratsioon suhteliselt madalam kui teistes jookides, järeldati, et tegemist võib olla mõõtmisveaga. Kromatograafiline analüüs teostati lainepikkustel 224 nm ja 254 nm, kasutades C-18 kolonni ja eluendina puhast metanooli. Kalibreerimiskõverad koostati piikide kõrguste põhjal. HPLC meetod osutus palju aeganõudvamaks ja selle tulemused ebamäärasteks. Meetodi tulemuste head reprodutseeritavust ja täielikult eraldatud kromatograafilisi piike ei saavutatud. Vastavalt kromatograafiliselt saadud andmetele leidub jookides sorbiinhapet kontsentratsioonis  $77,9 \pm 6,9$  kuni  $120,7$  mg/l-ni. Sarnaselt kui spektrofotomeetrilisel meetodil, Mountain Dew-s bensoehapet ei detekteeritud üldse ja teistes jookides selle maksimaalne registreeritud kontsentratsioon oli  $101,4$  mg/l. Vastavalt seadusega kehtestatud normidele bensoehappe ja bensoaatide sisaldus karastusjookides ei tohi ületada  $150$  mg/l ning sorbiinhappe sisalduse lubatud piirmäär üksi on  $300$  mg/l ja  $250$  mg/l, kui kasutatakse koos bensoehappe või bensoaadiga.

Antud töö tulemustest järeldeb, et kõigis analüüsitud jookides bensoehappe ja sorbiinhappe sisaldus ei ületa lubatud piirnormi. Kuid selgus, et Kanes joogi etiketil olev teave ei vasta tõele, kuna nii spektrofotomeetriliselt, kui ka kromatograafiliselt tuvastati selles mõlemad uuritud säilitusained.

## Abstract

### Determination of preservatives in soft drinks using HPLC and Spectrophotometry

The aim of this work was to determine the content levels of two commonly used preservatives in soft drinks. Benzoic and sorbic acids were investigated as preservatives. Due to the low solubility of these acids in aqueous solutions, their alkali metal salts are being used, so the experimental study was performed using sodium benzoate and potassium sorbate. Samples of five soft drinks from different brands were examined: Kanes, Valge Klaar, Enjoy, Mountain Dew and Active, three of which, according to the labels, contain both preservatives and two contain only sorbate. Analysis of the preservatives was conducted by UV-Vis spectrophotometry and reversed phase high-pressure liquid chromatography (HPLC). Both analytical methods were compared and their suitability for the analysis of preservatives was evaluated.

During the spectrophotometric analysis, the calibration curve method was found to be unsuitable for data processing due to overlapping absorption spectras of the studied preservatives. Therefore, additional calculations had to be made, taking into account the overlapping of the components. Absorption maximum wavelenghts were obtained at 254 nm for potassium sorbate and 224 nm for sodium sorbate. The results of this method showed that the analyzed drinks contain benzoic acid in the range of  $35,9 \pm 0,3$  mg/l -  $136,2 \pm 4,1$  mg/l and sorbic acid in the range of  $146,7 \pm 0,2$  mg/l -  $187,6 \pm 0,2$  mg/l. According to information on food labels provided by the manufacturer, Kanes and Mountain Dew should only contain potassium sorbate, however presence of both preservatives was detected. As Mountain Dew has a relatively lower concentration of benzoic acid than other examined drinks, it was concluded that this could be a measurement error. Chromatographic analysis was performed at 224 nm and 254 nm using a C-18 column and pure methanol as eluent. The calibration curves were drawn from the heights of the peaks. HPLC proved to be much more time-consuming and its results uncertain. The reproducibility of the method and the chromatographic separation of preservatives were not achieved. According to chromatographic results, sorbic acid is present in analysed samples in concentrations ranging from  $77,9 \pm 6,9$  mg/l to 120,7 mg/l. Same as in the spectrophotometric method, no benzoic acid was detected in Mountain Dew, while the maximum concentration recorded in other drink samples was 101,4 mg/l. In accordance with the EU regulations, the content of benzoic acid and benzoates in soft drinks must not exceed 150 mg/l, and the maximum level of sorbic acid alone is 300 mg/l and 250 mg/l when used in combination with benzoic acid or benzoate.

The results obtained from this study showed that the quantity levels of studied benzoic and sorbic acids in all drinks analysed are below the legal limits. However, Kanes' label information turned out to be inaccurate, as both preservatives were detected both spectrophotometrically and chromatographically.

## Lühendite loetelu

EL- Euroopa Liit

EÜ- Euroopa Ühendus

EFSA- Euroopa Toiduohutusamet: ingl. k. European Food Safety Authority

SCF- Toidu teaduskomitee: ingl. k. Scientific Committee on Food

ANS- Toidu lisaainete ja toidule lisatud toidu toitainete allikate paneel: ingl. k. the Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food

JECFA- FAO/WHO ühine lisaainete ekspertkomisjon: ingl. k. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

FAO- Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon: ingl.k. Food and Agriculture Organization of the United Nations

WHO- Maailma Terviseorganisatsioon: ingl. k. World Health Organization

FDA- USA Toidu- ja Ravimite Nõukogu: ingl. k. Food and Drug Administration

ADI- aktsepteeritav päevane piirkogus: ingl. k. acceptable daily intake

HPLC- kõrgsurve vedelikkromatograafia: ingl. k. high pressure (performance) liquid chromatography

RP-HPLC- pööratud faasi kõrgsurve vedelikkromatograafia: ingl. k. reversed-phase high pressure (performance) liquid chromatography

UV- ultraviolet: ingl. k. ultraviolet

VIS- nähtav: ingl. k. visible

A - absorptsioon; neelduvus

PVDF- Polüvinülideenfluoriid: ingl. k. Polyvinylidene difluoride

PTFE- Polütetrafluoretüleen: ingl. k. Polytetra-fluorethylene

## Sissejuhatus

Janu on inimkeha füsioloogiline vajadus. Selle kustutamiseks on inimesed harjunud tarbima lisaks tavalisele joogiveele ka teisi jooke. Oma eelistustest ja elustiilist lähtuvalt saab igaüks valida endale sobiva joogi. Karastusjoogid on tänapäeval eriti populaarsed. Need on sageli karboniseeritud, maitsestatud ja erilise värviga, mistõttu äratavad tarbijates huvi.

Nagu iga teinegi toit, kipuvad ka joogid riknema. Mikroorganismid, oksüdatsioon, ebaõige ladustamine ja muud tegurid võivad mõjutada joogi ohutust, lühendades seeläbi selle säilivusaega. Tarbija kaitsmiseks ja toote eluea pikendamiseks kasutatakse erinevaid säilitusviise. Üks neist on keemiline konserveerimine ehk säilitusainete kasutamine. Kõige levinumad säilitusained on bensoe- ja sorbiinhapped, mida leidub looduses, kuid toidutööstuses kasutatakse pigem sünteetilisi happeid ning nende soolaid – naatriumbensoaati ja kaaliumsorbaati. Hapete madala vees lahustuvuse tõttu kasutatakse jookide valmistamisel nende soolaid.

Hoolimata säilitusainete kasulikust mõjust on ikkagi tegemist kemikaalidega, mis ühel või teisel määral organismi sattudes seda mõjutavad. Kombinatsioonis mõnede jookides sisalduvate komponentidega võivad tekkida ohtlikud ained nn. kantserogeenid. Euroopa Liidus testitakse ja hinnatakse lisaaineid toidusobivuse suhtes. Kuna ainete liigne tarbimine võib ka kõrvaltoimeid põhjustada, nende maksimaalne sisaldus toidus seadusega rangelt määratud. Toiduohutuse organisatsioonide poolt on loodud ADI (Acceptable Daily Intake) süsteem, mis kehtestab päevase lisaaine piirkoguse. Bensoatide ja sorbaatide negatiivne mõju tervisele on endiselt murettekitav ja on eriti oluline jälgida, et nende tarbimine jääks vastuvõetud päevanormi piiresse. Uurimisandmete põhjal peetakse säilitusaineid ohutuks, kuid kõrvalmõjudega juhtumeid esineb jätkuvalt.

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks on määrata kindlaks jookide levinumate säilitusainete – bensoe- ja sorbiinhapete, kvantitatiivne sisaldus. Katseid teostatakse nende soolade naatriumbensoaadi ja kaaliumsorbaadiga. Kuna tootja poolt on kohustuslik toote etiketile märgistada selle koostisosade loetelu, on oluline välja selgitada, kas säilitusainete olemasolu vastab pakendil kirjas olevale ja kas nende kontsentratsioonid jäävad lubatud piiridesse. Katseteks valitakse erinevate tootjate Eestis müüdavad karastusjooke, millest neli on gaseeritud ja üks mahla sisaldav. Uuritavate ainete kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutatakse UV-Vis spektrofotomeetriat ja pööratud faasi kõrgsurve vedelikkromatograafiat. Meetodeid võrreldakse omavahel ja hinnatakse sobivust säilitusainete kvantitatiivseks analüüsiks.



# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Toidu lisaainete süstemaatika

### 1.1.1 Lisaained

Toidu lisaained on toiduainetööstuses kasutatavad ained, mida ei kasutata eraldiseisva toote või koostisosana, vaid lisatakse toidule erinevatel eesmärkidel, näiteks toote ohutuse ja vastupidavuse parandamiseks, takistades mikroorganismide kasvu, keemilisi ja ensümaatilisi reaktsioone ning parandades selle nii väliseid omadusi nagu värvi ja tekstuuri, kui ka maitset (1,2). Toidu lisaaineid on palju ja iga tüüpi kasutatakse konkreetse ülesande täitmiseks. Lisaained võivad olla looduslikku päritoluga, sünteetilised, kuid sarnased looduslike komponentidega või täiesti kunstlikult loodud (3).

### 1.1.2 EL määrused

Toidulisandite kasutamine on seadusega rangelt reguleeritud. EL-s peavad lisaained vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1333/2008 täielikult vastama toidus kasutamiseks lubamise tingimustele ja kriteeriumidele (4). Praegu lisaaineid testib ja hindab Euroopa Toiduohutusameti (EFSA) toidu lisaainete ja toidule lisatud toidu toitainete allikate paneel (ANS Panel), misjärel lisatakse need EL-s heakskiidetud toodete loetellu ning need jäävad ka pideva järelevalve alla ja andmeid uuendatakse. Enne EFSA loomist tegeles sellega Toidu Teaduskomitee (SCF). Seega määratleti EL-s 26 erinevat toidu lisaainete klassi, sõltuvalt nende tehnoloogilistest funktsioonidest. Nimekirjas on lisaained nagu antioksidandid, emulgaatorid, magusained, värvained, säilitusained jm. (1).

Toidu lisaainete märgistamist sätestab ka määrus (EÜ) nr 1333/2008, mis ütleb, et „lõpptarbijale müügiks ette nähtud toidu lisaaineid võib turustada vaid juhul, kui nende pakendile on kantud käesolevas määruses iga toidu lisaaine kohta sätestatud nimi ja E-number või müüginimetus, mis sisaldab iga toidu lisaaine nime ja E-numbrit“ (4). 1986. aastal võeti Euroopa Liidus esmakordselt kasutusele E-numbriline süsteem (1). See identifitseerimissüsteem võimaldab lühendada lisaainete pikki nimetusi ja selle eesmärk on veenda tarbijat nende ohutuses. Täht E näitab, et toidulisand on testitud ja tunnustatud ohutuks, millele järgneb kolme- või neljakohaline kood, mis identifitseerib konkreetse toidulisandi (5).

Värvained - E100-180. Neid kasutatakse toidule värvi andmiseks ja välimuse parandamiseks.

Säilitusained - E200-285, 1105 - kaitsevad bakterite toime eest, pikendavad toiduainete säilivusaega.

Antioksidandid - E300-321, E392, E586 - pikendavad toodete säilivusaega, vältides või vähendades toidu oksüdatsiooni.

Emulgaatorid, stabilisaatorid ja paksendajad - E322, E400-495, E1103 - parandavad toodete stabiilsust ja tekstuuri, aitavad saavutada soovitud struktuuri, soodustavad erinevate faaside segude homogeniseerumist ja takistavad komponentide eraldumist.

Magusained - E420, E421, E950-969 - on loodud selleks, et muuta toidu maitse magusamaks (3,5).

Kuna tegemist on kemikaalidega, on vaja teada lisaaineid sisaldavate toodete tarbimise riske ja toksikoloogilisi aspekte. Iga aine ohutu tarbitava koguse kindlaksmääramiseks on riiklikud organisatsioonid nagu EFSA ja JECFA (FAO/WHO ühine toidulisandite ekspertkomitee) kasutusele võtnud ADI (Acceptable Daily Intake) riskihindamise süsteemi. See süsteem viitab aine kogusele, mida inimene tarbib päevas ilma olulise tervisekahjustuseta, ja seda väljendatakse tavaliselt mg-des kehakaalu kilogrammi kohta päevas (1).

### 1.1.3 Säilitusained

Säilitusained on üks toidu lisaainete klassidest, mida kasutatakse toiduainete riknemise vältimiseks ning säilivusaja pikendamiseks. Nende eesmärk on kaitsta mikroobide aktiivsuse eest ja vältida soovimatuid keemilisi muutusi. Nagu teisedki lisaained, võivad säilitusained olla looduslikud või kunstlikud (6).

Looduslikud säilitusained sisaldavad ainult looduslikke koostisosi ja neid ekstraheeritakse taimedest, loomadest või mikroorganismidest. Näiteks laktoperoksüdaas leiti piimas ja lüsoosüüm munavalges (3). Mõned ained on kõigile kättesaadavad ja sageli köögis kasutatavad, näiteks sool, suhkur, sibul. Kunstlikud on looduses leiduvate komponentide, näiteks orgaaniliste hapete, koopiad, kuid on identselt loodud. Ja ka täiesti sünteetilised ehk inimese poolt välja töötatud ja sünteesitud, mitte ühegi loodusliku komponendiga sarnased. Nii on võimalik reguleerida säilitusainete vajalikke omadusi (7,8).

Säilitusained võib allika ja toimemehhanismi alusel jagada mitmeks tüübiks (9):

Antimikroobsed ained: lisandid, mis pärivad, aeglustavad või takistavad bakterite, pärm- ja hallitusseente kasvu ja paljunemist, vähendades vee aktiivsust ja happesust. Tüüpilised esindajad on säilitusained nagu bensoe- ja sorbiinhapped ning nende soolad, nitraadid ja nitritid, propüül, isobutüül jne. Säilitusainete looduslikud allikad on mikroorganismid, loomad ja taimed. Eeterlikud õlid on taimse päritoluga säilitusained, nitsiin ja natamütsiin on mikroorganismidest pärinevad säilitusained ning lüsoosüüm on näide loomse päritoluga säilitusainetest (8,9).

Antioksidandid: kasutatakse toidu riknemise vältimiseks oksüdatiivsete mehhanismide kaudu. Võib esineda kahte tüüpi oksüdatsioon: köögiviljade ja puuviljade ensümaatiline oksüdatsioon ning rasvade ja õlide oksüdatsioon ja rääsumine. Samuti on nii looduslikke kui ka sünteetilisi. Taimed võimaldavad saada neist looduslikke antioksidante, nagu tokoferoole ja polüfenoole. Sünteetilised esindajad on butüülhüdrosüanisool, butüülhüdrosütolueen, tert-butüülhüdrokinoon jne. (8,9).

Pruunivastased ained: säilitusained, mida kasutatakse toidu pruuniks muutumise vältimiseks ensümaatilise või mitteensümaatilise reaktsiooni tõttu. Mitteensümaatilise pruunistumine toimub toote redutseeriva suhkru ja vabade aminohapete vahelise keemilise reaktsiooni tulemusena ilma ensüümide osaluseta, mille tagajärjel moodustub pruun melaniini pigment (8,10). Ensümaatilise pruunistumine toimub ensüümi polüfenooloksüdaasi ja toidus sisalduvate fenoolsete ühendite tõttu. Hapnikuga kokkupuutel käivitatakse fenoolide oksüdatsioon kinoonideks ja toode tumeneb. Selle vältimiseks kasutatakse happeid, nagu askorbiinhape ja sidrunhape, sulfiteid, N-atsetüültsüsteiini, heksüülresortsinooli jt. Teatud toite, nagu sibul, ananass, vein ja sidrun, peetakse looduslikeks inhibiitoriteks (10).

## 1.2 Karastus- ja mahlajookide iseloomustus

### 1.2.1 Joogi morfoloogia

Joogiks loetakse mis tahes joomiseks mõeldud vedelikku, mis on võimeline janu kustutama. Määratlus hõlmab nii kuumi kui ka külmi jooke (11). Joogid liigitatakse alkoholseteks, mittealkoholseteks ja piimapõhisteks jookideks. Alkoholivabu jooke võib liigitada karastusjookideks (nt puuviljamahlad ja karboniseeritud joogid) ning kuumadeks (nt tee ja kohv) jookideks (12). Piimapõhised joogid erinevad teistest oma kõrge emulgeerivate valkude ja rasvade sisalduse poolest (nt piim, piimakokteilid, piimamahlajoogid) (9).

### 1.2.2 Karastusjoogid ja nende klassifikatsioon

Karastusjoogid on joogi- või mineraalveel põhinevad joogid, mis saavad olla gaseeritud ja millede etüülalkoholi sisaldus ei ületa 0,5% (13). Nende maitsestamisel kasutatakse looduslikke või kunstlikke aineid, on sageli värvilised ja sisaldavad puuviljamahla, viljaliha või muid looduslikke koostisosi. Sellesse kategooriasse kuuluvad: pudelivesi; gaseeritud joogid; 100% mahlad ja nektarid; kontsentraadid; ja gaseerimata joogid, sealhulgas külmad tee- ja kohvijoogid, spordijoogid ja madala mahlasisaldusega joogid (12).

Mahlajoogid sisaldavad kuni 50% mahla ja jagunevad mitmeks tüübiks, olenevalt mahlasisalduse protsendist (13):

- nektarid (25 kuni 50%);
- mahlajoogid (6,0 kuni 24,9%);
- puuviljajoogid (3,0 kuni 5,9%);
- limonaadid (kuni 2,9%).

Karastusjoogid jagunevad peamiselt kahte tüüpi, *Ready to drink* ehk joogivalmis ja kontsentreeritud (11).

*Ready to drink* kategooriasse kuuluvad gaseeritud ja gaseerimata joogid. Süsinikdioksiidi olemasolu tõttu arvatakse, et gaseeritud joogid omavad tõhusat antimikroobset toimet pärmi ja hallituse vastu. Süsinikdioksiid on pärmseene vastu tõhus tänu oma võimele takistada sahharoosi etanooliks kääritamise kõrvalsaadusena rohkema CO<sub>2</sub> teket. Lisaks jätab see hallitusseened ilma hapnikust, mis on kasvuks kõige vajalikum. Gaseerimata joogid aga ei sisalda süsihappegaasi, seega pole need kaitstud bakteriaalse saastumise eest ning tuleb ette näha muud säilitusmeetodid, mis raskendab nende tootmist (12).

Kontsentreeritud vorm sisaldab jooke, mille kuivainesisaldus on 15% või rohkem. Selliseid kontsentraate lahjendatakse edasi, et saada lahjendatud karastusjooke, mida tuntakse kui joogivalmis (11,13). Enamik kontsentreeritud jooke sisaldab puuviljamahla või terveid puuvilju. Kontsentreeritud karastusjookide säilitamise meetodid hõlmavad kiirpastöriseerimist ja keemilist konserveerimist (11).

### 1.2.3 Karastusjookide koostis

Olenemata kategooriast sisaldavad karastusjoogid vett, magusainet, hapestavaid aineid, maitseaineid, värvaineid ja säilitusaineid (12).

Vesi on kõigide selliste jookide põhikomponent ja moodustab tavaliselt 82-99% joogi mahust. See toimib teiste koostisosade kandjana ja tagab organismile vajaliku vee koguse. Vesi peab rangelt vastama nõuetele, kuna joogi maitse, välimus ja füüsikaline mikrobioloogiline stabiilsus sõltuvad suuresti selle puhtusest ja kvaliteedist (11,12). Vesi peab olema puhas, läbipaistev, steriilne, maitse ja lõhnata. Ei tohi sisaldada hõljuvaid osakesi, orgaanilisi aineid, liigseid mineraalsoleid ega lahustuvat hapnikku (12,13). Vee leeliselisuse ja üldkareduse taset tuleks hoida tasemel 50 mg/l väljendatuna kaltsiumkarbonaadina(12).

Magusained on vajalik komponent peaaegu kõigis jookides. Nad annavad magusa maitse ja omavad kõrget energiaväärtust. Sahharoos, mida tavaliselt nimetatakse suhkruks, on magususe standard. Kaasajal kasutatakse paljudes jookides selle asendajaid (13). Jookides kasutatavad magusained jagunevad üldiselt kolme kategooriasse: süsivesikutega magusained (nagu sahharoos, glükoos, invertsiirupid ja kõrge fruktoosisisaldusega maisisiirupid), intensiivsed magusained (nagu sahhariin, tsüklamaat, atsesulfaam-K ja stevia) ja segamagusained (kasutatakse kombinatsioonis). Intensiivsed magusained on enamasti sünteetilised ja on suhkrust mitu ühikut magusamad, kuid sisaldavad vähe kaloreid. Tänu sellele kasutatakse neid laialdaselt madala kalorsusega jookides (1,11). Puuviljamahlad, olenevalt kasutatud puuviljadest, sisaldavad algselt glükoosi, fruktoosi ja isegi sahharoosi (12).

Karastusjookide koostises on hapendajad tavaliselt kolmandal kohal (14). Nad täidavad mitmeid olulisi funktsioone: tugevdavad maitset; on janu kustutava toimega, sest stimuleerivad sülje väljavoolu suus; mõjutavad joogi magususe astet; ning omavad ka säilitusomadusi, alandades toote pH-d (3,12). Jookides on kõige sagedamini kasutatavad happed sidrun- ja fosforhape (14). Laialdaselt kasutatakse ka viin-, piim-, äädik-, õun-, fumaar- ja askorbiinhapet (12).

Joogile lisatakse toidu lõhna- ja maitseaineid, et muuta see ainulaadseks, luues teatavaid sensoorseid omadusi. Kuna maitse ja lõhn on toote osad, mis toodet identifitseerivad, võimaldavad need lisained tarbijatel selgelt eristada jookide maitsete ja lõhnade erinevusi (11,12). Need koosnevad maitsete segudest ja on looduslikud, looduslikult identseid ja täiesti kunstlikud. Samuti jagunevad veega segunevateks ja vees dispergeeruvateks. Veega segunev lahustub vees kergesti, põhjustamata joogis kõrvalmõjusid. Nende hulka kuuluvad maitseained nagu vanilliin, etüülalkohol ja propüleenglükool (12). Vees dispergeeruvaid kasutatakse jookides emulsioonidena, kuna neis sisalduvad õlikomponendid ei lahustu vees ja võivad moodustada joogis nähtavaid osakesi. Tänu õlifaasile toimivad emulsioonid ka hägustajatena (11).

Värvained ei oma toiteväärtust ja täidavad vaid esteetilist funktsiooni. Need parandavad joogi visuaalset komponenti, meelitades seeläbi tarbijaid. Kuid mõnikord võimaldab joogi värvus määrata toote seisundit, näiteks selle värskust, ebaõige ladustamise või mikroobse saastumise tagajärjel. On looduslikke ja kunstlikke värvaineid. Looduslikke värvaineid ekstraheeritakse taimedest, nagu peedipunane, paprika, kurkum, aga ka mikroorganismidest, näiteks karmiin (12). Sellised värvained on aga vähem vastupidavad kuumusele, valgusele või pH-le kui sünteetilised (8). Enamik looduslikke ja looduslikult identseid kunstlikke värvaineid on hüdrofoobsed ja seetõttu vees lahustumatud. Toidus kasutamiseks tuleb neid eelnevalt töödelda. Üks võimalus on muuta need naatriumi- või kaaliumisooladeks, muutes need seeläbi vees lahustuvaks. Kunstlikud värvained, vastupidi, on enamasti hüdrofiilsed, mille pärast need on vees lahustuvad (3). Jookides

kasutatavate vees lahustuvate sünteetiliste värvide hulka kuuluvad päikeseloojangukollane, tartrasiin, kiniinikollane ja briljantsinine FCF (8,11).

Joogi üks olulisemaid komponente on säilitusained. Need võimaldavad pikendada toote säilivusaega, takistades mikroorganismide, nagu bakterid, hallitus ja pärm, kasvu. Mikroorganismide tegevusest põhjustatud joogi riknemine saab rikkuda mitte ainult joogi maitset ja lõhna, vaid põhjustada ka toksiinide tootmist, mis võib viia toidumürgistuseeni (1,12). Lähemalt karastusjookides kasutatavate säilitusainete kohta vt. järgmine punkt 1.3.

### 1.3 Säilitusained karastus-ja mahlajookides

Peamised karastusjookides heakskiidetud ja kasutatavad säilitusained on bensoehape, sorbiinhape, vääveldioksiid ja nende alternatiivid soolade kujul (9,12).

#### 1.3.1 Vääveldioksiid



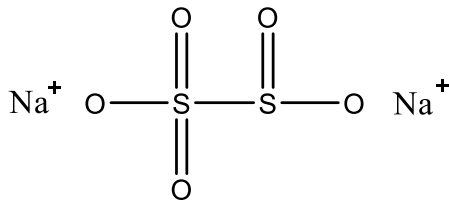
Joonis 1. Vääveldioksiidi struktuur.

Vääveldioksiidi, millele viidatakse kui E220, peetakse väga tõhusaks säilitusaineks, kuna sellel on tugev antimikroobne toime ja see täidab ka antioksidantseid funktsioone (9). Tänu oma valmistamise lihtsusele on gaasilisel kujul olev vääveldioksiid üks varasemaid keemilisi säilitusaineid, mida on inimeste poolt toodetud ja kasutatud. Juba Rooma impeeriumi ajal kasutati seda säilitusainena, põletades väävlit enne veini tunnidesse või kannudesse hoidmiseks sulgemist (12). Kuna  $\text{SO}_2$  gaasilisel kujul ei ole toiduainetes mugav kasutada, muudetakse see sooladeks (15). Kui vääveldioksiid lahustub vees, moodustab see sulfitid (16). Allpool on toodud tasakaalureaktsioon, milles  $\text{HSO}_3^-$  on vesiniksulfitioon ja  $\text{SO}_3^{2-}$  sulfitioon:



Sulfitidel on vabu ja seotud vorme. Säilitusaine aktiivsus on seotud vabade sulfitite kontsentratsiooniga. Toitudes ja jookides väljendatakse neid tavaliselt  $\text{SO}_2$  teoreetiliste saagiste või "ekvivalentidena". Sõltuvalt toote olemusest ning tootmis- ja ladustamistingimustest reageerivad sulfitid keemiliste komponentidega, nagu redutseerivad suhkrud, aldehüüdid, ketoonid ja valgud, moodustades kombineeritud ühendeid (17). Kui sulfit reageerib teise molekuliga ja muutub selle struktuuri osaks, ei osale see enam tasakaalureaktsioonis ja seda nimetatakse seotuks. Sulfitid, mis endiselt tasakaalureaktsioonis osalevad, nimetatakse vabadeks. Kuigi säilitusefekti annavad vaid vabad sulfitid, on vaja teada ka nende koguhulka koos seotud komponentidega, mida nimetatakse üld  $\text{SO}_2$ -ks (16).

Peamised kasutatavad soolad on naatriumi ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ja kaaliumi ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) metabisulfitid, samuti naatriumsulfitid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) ja -vesiniksulfitid ( $\text{NaHSO}_3$ ) (15). Ühe soola – naatriummetabisulfiti struktuurivalem on näidatud alloleval joonisel.



Joonis 2. Naatriummetabisulfiti struktuur

Lisaks antibakteriaalsele toimele on need tugevad antioksüdandid, neid kasutatakse stabilisaatoritena ja nad mängivad pruunistusvastaste ainete rolli nii ensümaatilistes kui ka mitteensümaatilistes reaktsioonides (9,15).

Toiduainetööstuses kasutatakse neid peamiselt puu- ja juurvilju sisaldavates toodetes, sh kuivatatud puu- ja juurviljades, mahlades, karastusjookides ja veinis. Vääveldioksiidil ja sulfitidel on antimikroobne toime optimaalse efektiivsusega pH väärtusel alla 4,0. Mahlade ja jookide valmistamisel välditakse mikroobset rikenemist malolakti- ja äädikhappebakterite, pärm- ja hallitusseente pärssimisega (18).

Vääveldioksiid ja sulfitid on EL-s lubatud toidu lisaainetena vastavalt määruse (EÜ) nr 1333/2008 II ja III lisale ning neid on lubatud kasutada nii toiduainetes kui ka koos teiste toidu lisaainete, ensüümide, maitse- ja toitainetega (17). Määruse (EÜ) nr 1333/2008 II lisa kohaselt on vääveldioksiidi ja selle soolade (E220-228) piirnorm vääveldioksiidis (mg/l) väljendatud (19):

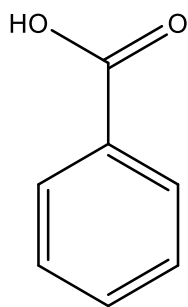
- puu- ja köögiviljamahlades 50-350 mg/l, kontsentreeritud viinamarjamahlas veinivalmistamiseks kuni 2000 mg/l;
- mahla sisaldavates alkoholivabades maitsestatud jookides 20 mg/l (kontsentraadi jäägid);
- puuviljamahla baasil valmistatud kontsentraatides, mis sisaldavad vähemalt 2,5% otra (odratumm) 250-350 mg/l;
- vähemalt 235 g/l glükoosisiirupit sisaldavates alkoholivabades maitsestatud jookides 50 mg/l;
- mahlades 50-350 mg/l.

Vääveldioksiidil ja selle sooladel esinevad ka kõrvaltoimed ning võivad mõnel inimesel põhjustada talumatust. Uuringud on näidanud, et suukaudsel manustamisel võib see põhjustada allergilisi reaktsioone sulfititele tundlikel inimestel, peamiselt astmahaigetel (19). Tundlikkus nende suhtes võib aga avalduda igal eluajal. Täheldatud on ka selliseid kõrvaltoimeid nagu anafülaktiline reaktsioon, dermatiit, urtikaaria, õhetus, hüpotensioon, kõhuvalu ja kõhulahtisus (17).

JECFA on määranud vääveldioksiidi ja sulfitide vastuvõetavaks päevaseks koguseks 0–0,7 mg/kg kehakaalu kohta päevas (19).

### 1.3.2 Bensoehape ja bensoaadid

Bensoehape - orgaaniline nõrk hape, mida kasutatakse säilitusainena numbri E210 all, on üks vanimaid ja enim kasutatud lisaaineid toiduainetööstuses happelistes toodetes. Eriti levinud on see mahlade ja karastusjookide valmistamisel (3,20). See on aromaadne karboksüülhape, mis koosneb benseenituumast, mis on seotud karboksüülrühmaga (21). Selle struktuurivalem on näidatud joonisel 3.

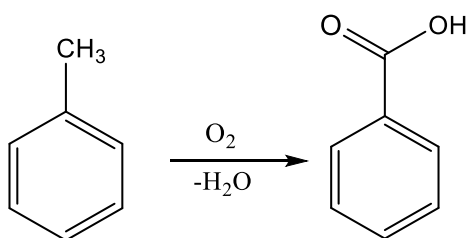


Joonis 3. Bensoehappe struktuur

Sellel on mikroorganismide kasvu pärssivad omadused. Antimikroobse toime mehhanism orgaanilise happena seisneb mikroobirakkude sisemise pH taseme hävitamises (22). Kuna nõrk hape dissotsieerub vaid osaliselt, erinevalt dissotsieerunud molekulidest, suudavad dissotsieerumata molekulid tungida läbi rakumembraani tänu oma heale lahustuvusele lipiidides. Kui hape tungib läbi lipiidiseina tsütoplasmasse, mille pH on kõrgem, dissotsieerub hape prootoniteks ja anioonideks. Prootonid kogunevad tsütosooli, alandades rakusisest pH-d, mis aeglustab mikroorganismide ainevahetust ja loob ebasoodsad tingimused nende arenguks (3,21). Seetõttu saavutatakse bensoehappe maksimaalne antimikroobne efektiivsus pH vahemikus 2,5-4,5 (21). Aga seda ei kasutata ainult happelistes toitudes, kuna see võib vähendada ka teatud hallitusseente ja pärmseente teket, mis arenevad happelises keskkonnas (20). Tõhusam on toime pärmi- ja hallitusseente vastu ning vähem bakterite vastu (2).

Bensoehapet leidub looduslikult mõnedes puu- ja köögiviljades, nagu ploomid, tomatid, õunad, kaneel ja eriti jõhvikates, kus seda leidub umbes 0,08 massiprotsenti (3,12). Võib tekkida ka mikroobse tegevuse tõttu, näiteks piimatoodetes piimhappebakterite poolt (20). Seda leidub ka vaikudes. Esmalt ekstraheeriti see stüraksi "bensoe" puude balsamico vaigust, millest tuleneb ka happe nimi (21,23). See vaik sisaldab kuni 20% bensoehapet (21).

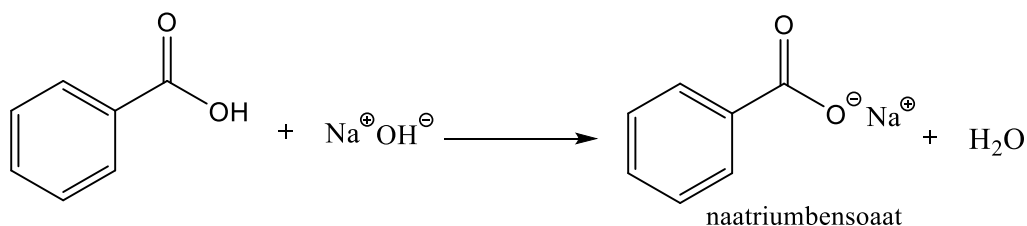
Kuigi bensoehapet leidub looduses, sünteesitakse see tööstuslikus tootmises kasutamiseks keemiliselt. Bensoehape saadakse tolueni osalisel oksüdeerimisel hapnikuga, vt joonis 4 (23).



Joonis 4. Bensoehappe saamine (23)

Normaaltemperatuuril lahustub see vees halvasti, mistõttu kasutatakse seda jookides lahustuva ja stabiilsema soola kujul (3,22). Naatrium-, kaalium- ja kaltsiumbensoaadid on aluselised happesoolad valge või värvitu lõhnatu kristalse pulbri kujul ja kergelt magusa maitsega (21). Nende kasutamine pärineb 1900. aastate algusest (1). Ja esimene säilitusaine, mille USA-s FDA toidus kasutamiseks heaks kiitis, oli naatriumbensoaat (E211). Soolade süntees (joonis 5) viiakse

läbi bensoehappe neutraliseerimisel vastavate hüdroksiididega või kuumutamisel sobivate kontsentreeritud karbonaatidega (21).



Joonis 5. Naatriumbensoaatide saamine naatriumhüdroksiidiga neutraliseerimisel (21)

Toidu lisaaineid käsitleva määruse (EÜ) nr 1333/2008 II ja III lisa kohaselt on bensoehape (E210), naatriumbensoaat (E211), kaaliumbensoaat (E212) ja kaltsiumbensoaat (E213) EL-s toidu lisaainetena lubatud. Bensoehappe ja selle soolade jaoks on JECFA kehtestanud ADI-ks 0–5 mg/kg kehamaassi kohta (24).

Vaatamata sellele, et neid aineid peetakse ohututeks, on siiski tuvastatud mõned kõrvalmõjud tarbijate tervisele, eriti tundlikel inimestel. Tagajärjed hõlmavad mitmesuguseid allergilisi reaktsioone, mis põhjustavad silmade, naha ja hingamisteede ärritust (20). Samuti on teatatud urtikaaria, metaboolse atsidoosi, krampide, maoärrituse jms juhtudest (2,25). Uuringud on näidanud, et mõned reaktsioonid tekivad tundlikel inimestel annustes, mis on isegi väiksemad kui lubatud ADI ning inimesed, kes põevad teatud haigusi, võivad taluda isegi väikeseid bensoaadi annuseid (24).

Bensoaatide ohtlikuks omaduseks on mõnel juhul benseeni moodustumine, mis omakorda on genotoksiline kantserogeen, mille Rahvusvaheline Vähiuuringute Agentuur on klassifitseerinud inimesele kantserogeenseks (1. rühm) (24). Joogiveses väikestes kontsentratsioonides esinevate askorbiinhappe (C-vitamiin) ja siirdemetallide, nagu vask ja raud, juuresolekul bensoaat dekarboksüleerub ja moodustub benseen, reaktsioon võimendub kuumutamisel ja valguse käes (20,24). Seetõttu kasutatakse toiduainetööstuses bensoaate üha vähem, mis on samuti probleem, kuna tegemist on väga tõhusa säilitusainega (12).

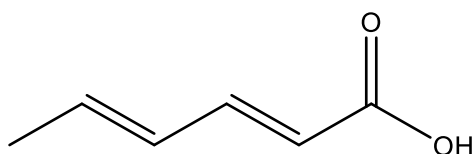
Vastavalt II lisale (EÜ) nr 1333/2008 on bensoehappe ja bensoaatide (E210–213) lubatud sisaldus erinevates jookides väljendatuna vaba bensoehappena (24):

- puu- ja köögiviljamahlades kuni 200 mg/l;
- puu- ja köögiviljanektarites kuni 150 mg/l;
- maitsestatud jookides kuni 150 mg/l.

### 1.3.3 Sorbiinhape ja sorbaadid

Sorbiinhape on küllastumata monokarboksüülhape, hästi tuntud säilitusaine numbri E200 all, mida kasutatakse laialdaselt toiduaine- ja farmaatsiatööstuses (23). See on sirge ahelaga rasvhape ja sisaldab on trans-konfiguratsioonis kahte C=C kaksiksidet (joonis 6) (1). See säilitusaine, kui seda kasutatakse kontsentratsiooniga kuni 0,3%, on lõhnatu ja värvitu (2).





Joonis 6. Sorbiinhappe struktuur

Sorbiinhape on looduslik säilitusaine ja seda leidub paljudes puu- ja köögiviljades, eriti küpsetes pihlakamarjades (*Sorbus aucuparia*), millest see esmakordselt ekstraheeriti ja mille järgi see ka oma nime sai (3). Tööstuses sünteesitakse sorbiinhapet keteeni ja krotoonaldehüüdi kondenseerimisel, selle reaktsiooni saadus on 3-hüdroksü-4-hekseenhappe polümeerne ester, mis seejärel laguneb, moodustades sorbiinhappe (26).

See säilitusaine on efektiivne erinevate mikroorganismide, peamiselt hallituse ja seente vastu, kuid mõjutab ka teatud tüüpi baktereid (1,2). Tõhusam katalaas-positiivsete ja aeroobsete bakterite vastu nagu *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ja *Serratia*. Hallituseente liikidest on pärsitud *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* ja *Fusarium* ning pärmseente liikidest *Candida*, *Saccharomyces* ja *Zygosaccharomyces* (6). Samuti leiti mükotoksiinide moodustumist pärssiv toime (27). Sorbiinhappe antimikroobse toime mehhanismid on erinevad. Näiteks on üheks funktsiooniks aminohapete omastamise ja paljude ensüümide, eriti sulfhüdrüüli, aktiivsuse pärssimine (25,27). Nagu teisedki orgaanilised happed, suudab see tänu oma lihtsale ehitusele ja väiksusele tungida läbi rakumembraani, põhjustades häireid rakusiseses transpordifunktsioonides ja metaboolses aktiivsuses (23,27). Sarnaselt bensoehappega mõjutab säilivusfunktsiooni just dissotsieerumata osa. Sorbiinhappe efektiivsus sõltub pH-st ja kasutatakse seda peamiselt happelistes toodetes. Kuid erinevalt bensoehapest saab seda kasutada ka kõrgemal pH tasemel 6,0-6,5 (3).

Sorbiinhape on vees halvasti lahustuv, mistõttu paljudes toodetes, näiteks jookides, asendatakse see kaaliumsorbaadi derivaadiga (2,3). On ka naatrium- ja kaltsiumsorbaate, kuid mõlemad ei ole EL-s lubatud lisaainete nimekirjas (26). Kaaliumisoola saamine seisneb sorbiinhappe neutraliseerimises kaaliumhüdroksiidiga. Teatud eesmärkide saavutamiseks kasutatakse sorbiinhapet ja sorbaate sageli koos teiste säilitusainetega, kuna neil kõigil on erinevad omadused. Näiteks jookides kombineeritakse seda sageli bensoehappe ja selle sooladega, mis võimaldab suurendada kaitset mikroorganismide eest (22,28).

Toidu lisaainetena on lubatud sorbiinhape (E200) ja kaaliumsorbaat (E202) vastavalt määruse (EÜ) nr 1333/2008 lisadele II ja III. Kuni 2018. aastani oli lubatud säilitusainete hulgas ka kaltsiumsorbaat, kuid pärast ümberhindamist otsustati see toksikoloogiliste andmete puudumise tõttu eemaldada (29,30). Viimase 2019. aasta kordushindamise kohaselt leiti, et sorbiinhappe ja kaaliumsorbaadi ADI on vaba sorbiinhappena väljendatuna 11 mg/kg kehmassi kohta (29).

Kuna sorbiinhape ja kaaliumsorbaat on kasutamiseks heaks kiidetud, peetakse neid tarbijate tervisele ohutuks ja neid liigitatakse kõige ohutumate säilitusainete hulka. Lubatud kontsentratsiooni ületamisel võivad aga tekkida kõrvaltoimed. Arvatakse, et sorbiinhape ja kaaliumsorbaat võivad põhjustada allergilisi reaktsioone, nagu silmade, naha ja hingamisteede ärritust. Mutageensed toimed ilmnesid ka sorbiinhappe koostoimel nitrititega ja

askorbiinhappegas rauasoolade juuresolekul (27). Nende ainete kombinatsioonid on üsna haruldased ja mutageensuse uuringuid peeti ebakindlaks, mistõttu sorbiinhappe ja selle soolade kooskasutamine nitritite ja askorbiinhappe ja rauasoolade juuresolekul ei olnud keelatud (27,29).

Vastavalt II lisale (EÜ) nr 1333/2008 on sorbiinhappe (E200) ja kaaliumsorbaadi (E202) maksimaalne lubatud piirnorm erinevates jookides väljendatuna vaba sorbiinhappena (27):

- puu- ja köögiviljamahlades kuni 500 mg/l;
- puu- ja köögiviljanektarites kuni 300 mg/l;
- maitsestatud jookides kuni 300 mg/l, kuid 250 mg/l, kui seda kasutatakse koos bensoehappe või bensoaatidega (E210-213).

## **1.4 Meetodid bensoaatide ja sorbaatide analüüsiks**

Analüütilise meetodi valik on uuringu oluline osa, kuna analüüsi edukus ja tulemuste täpsus sõltuvad suurel määral selle rakendamise optimaalsetest tingimustest. Arvesse tuleb võtta selliseid tegureid nagu meetodi usaldusväärsus, tundlikkus ja selektiivsus ning seda, et ainete hea lahutamine toimiks mõistliku aja jooksul (31,32). Samuti on oluline proovi õige ettevalmistamine. Erinevate analüüsi segavate komponentide olemasolu võib mõjutada selle tõhusust. Seetõttu on proovi puhastamiseks vaja läbi viia teatud toimingud, nagu destilleerimine, ekstraheerimine, lahjendamine, homogeniseerimine jne. Meetodi valik sõltub uuritava proovi iseloomust ja analüüsi tüübist (31).

Sünteesiliste lisaainete koguse määramiseks toitudes ja jookides kasutatakse palju meetodeid. Põhimõtteliselt jagunevad need meetodid spektroskoopilisteks, kromatograafilisteks ja elektroanalüütilisteks (31). Bensoe- ja sorbiinhapete soolade sisalduse määramiseks vedelates toodetes, nagu jogurtid, moosid jne, kasutatakse HPLC-d, õhukese kihi kromatograafiat, gaasikromatograafiat, spektrofotomeetriat, voltammeetriat jt (32,33). Tänapäeval on pöördfaasi HPLC tänu oma tundlikkusele, selektiivsusele ja kõrgele lahutusvõimele sorbaatide ja bensoaatide määramiseks toidutööstuses kõige sagedamini kasutatav meetod (32,34).

### **1.4.1 HPLC**

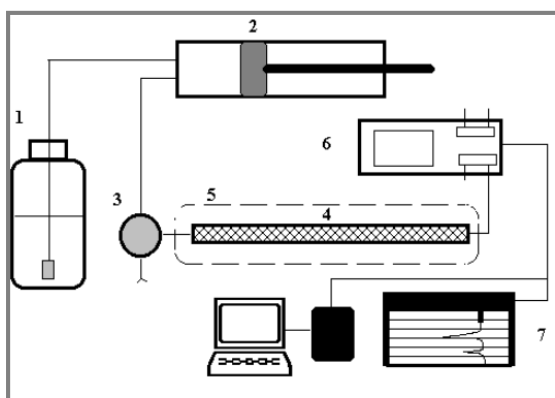
HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatography) on kolonnkromatograafia meetod komponentide eraldamiseks, identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks keerulistes vedelsegudes, milles liikuv faas ehk eluent on vedel (35). See meetod kasutab kõrget rõhku, et suruda solvent läbi mikroosakestega täidetud kolonnide, mille tulemuseks tagatakse kõrge eraldusvõime (36).

Protsessi põhimõte seisneb selles, et eraldatud ained liiguvad läbi sorbendiga pakitud kolonni (statsionaarne faas) koos liikuva faasiga (vedelikuga) erineva sorptsioonivõime tõttu erineva kiirusega. Kui ühendit ei sorbeerita, siis väljub see kolonnist eluendi voolukiirusel. Kui ühendid on sorbeeritud, jäävad need kolonni alles. Mida tugevam on ühendi sorptsioon, seda aeglasemalt see elueerub (37).

Sõltuvalt statsionaarse faasi agregaatolekust võivad olla vedelik-adsorptsioon (või tahke-vedelik) ja vedelik-vedelik interaktsioonid. Vedelate faaside polaarsuse järgi eristatakse normaalfaasi ja pöördfaasi kromatograafiat (37). Normaalfaasis kasutatakse polaarseid statsionaarseid faase ja mittepolaarseid liikuvaid faase. Analüüdid elueeruvad kolonnist alates kõige väiksema

polaarsusega ühendist ja sellele järgnevad teised ühendid nende polaarsuse kasvu järjekorras. See on kasulik madala kuni mõõduka polaarsusega analüütide eraldamisel ja kõrge lahustuvusega madala polaarsusega solventides. Pööratud faasis on statsionaarne faas mittepolaarne ja liikuv faas polaarne. Kõige polaarsem analüüt elueerub esimesena kolonnist, millele järgnevad teised analüüdid polaarsuse vähenemise järjekorras. Pööratudfaasikromatograafia on kasulik kõrge kuni keskmise polaarsusega ühendite eraldamiseks (35).

HPLC süsteem on näidatud joonisel 7 ja koosneb solvendianumast - 1, pumpamissüsteemist - 2, dosaatorist - 3, kõrgsurvekromatograafilisest kolonnist - 4, termostaadist - 5, detektorist - 6 ja arvutist seadmete juhtimiseks ja andmetötluseks - 7 (37).



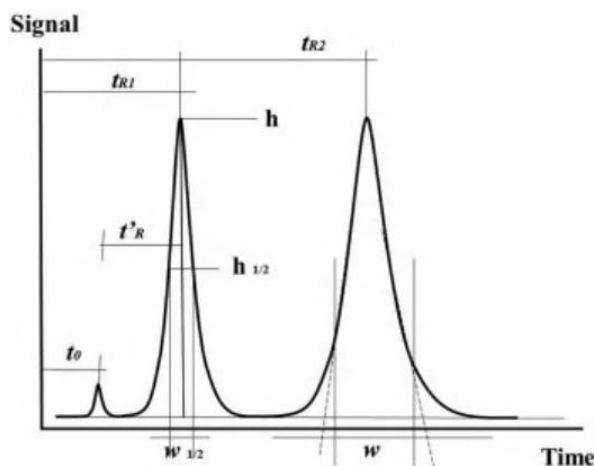
Joonis 7. Kõrgsurve vedelikkromatograafia süsteemi skemaatiline diagramm (37)

Kolonn on HPLC süsteemi nn süda, kus toimub komponentide lahutus. Need on valmistatud roostevabast terasest või plastikust, pikkusega 5-30 cm ja siseläbimõõduga 1-5 mm. Kolonn täidetakse soovitud statsionaarse faasiga (36,37). Mida väiksemad on selle osakesed, seda suurem on kolonni efektiivsus. Tüüpilised osakeste suurused HPLC-s on vahemikus 1,7 kuni 5  $\mu\text{m}$ . Kuna proovis või eluendis olevad tahked osakesed võivad kolonne kergesti kahjustada, tuleks proove enne seadmesse laadimist tsentrifuugida ja/või filtreerida läbi 0,45  $\mu\text{m}$  filtri. Lisakaitseks kasutatakse peakoloni ees lühikest kaitsekoloni, mis sisaldab sama statsionaarset faasi kui põhikolonn. See kaitseb põhikoloni, kõrvaldades peenosakesed ja tugevalt adsorbeerunud lahustunud ained (36).

Kolonni pakkimiseks kasutatakse kõige sagedamini modifitseeritud ränidioksiidi (silikageeli) baasil adsorbente (35,37). Need taluvad kõrget rõhku ja sobivad kokku enamiku orgaaniliste ja vesilahustega liikuva faasi solventidega (35). Vedelikkromatograafiline eraldamine toimub peamiselt keemiliselt seotud faasidena silikageelidel, mis laiendavad pH vahemikku ja parandavad sorbendi selektiivsust (37). Oktadetsüülsilaan ehk C-18 on kõige levinuim HPLC sorbent. Kasutatakse ka polümeere, näiteks tugevalt ristseotud stüreeni divinüülbenseeni, kuid sellel on väiksem efektiivsus ja mehaaniline tugevus (35).

On kaks elueerimisrežiimi – isokraatne ja gradient. Isokraatne elueerimine viiakse läbi ühe eluendiga (või eluentide konstantse seguga) (36). Tõhusaks eraldamiseks keerukamates analüüsides on vaja kasutada gradiendirežiimi, mille puhul toimub liikuva faasi koostise järkjärguline muutmine kogu eraldamise ajal (35).

Uuritava segu komponentide eraldumise tulemused kantakse kromatogrammile piikide kujul (joonis 8). Saadud piikide põhjal määratakse hulk näitajaid: laius ( $w$ ), kõrgus ( $h$ ), pindala ( $A$ ) jne (37).



Joonis 8. Tüüpilise kromatogrammi näidis (35)

Retentsiooniaeg ( $t_R$ ) on komponendi kõige olulisem kromatograafiline omadus. Praktikas määratakse retentsiooniaeg hetkest, mil aine proov sisestatakse kromatograafi, kuni hetkeni, mil registreeritakse detektori signaali maksimum (35,36).

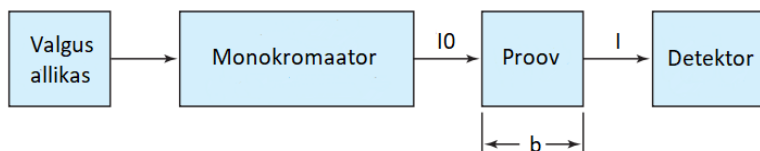
Kõige tavalisem tõhususe mõõt on teoreetiliste taldrikute arv ( $N$ ) – kromatograafilises kolonnis toimivate jaotustasakaalude arv. Mida suurem on teoreetiliste taldrikute arv, seda kitsam on piigi laius ja seda suurem on konkreetse kolonni eraldamise efektiivsus (35).

Piikide kõrgus ning pindala iseloomustavad komponentide kontsentratsiooni. Komponentide identifitseerimine toimub tavaliselt standardainete retentsiooniaegade kokkulangemise järgi (37).

#### 1.4.2 UV-VIS Spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on meetod keemiliste ühendite kontsentratsioonide mõõtmiseks valguse (elektromagnetkiirguse) abil (36). Spektrofotomeetrias kasutatakse peamiselt ultraviolettkiirgust, aga ka nähtavat valgust ja siis nimetatakse meetodit kolorimeetriaks. Spekter on kogu elektromagnetkiirguse lainepikkuste vahemik (38).

Spektrofotomeeter on seade, mis mõõdab küvetis oleva proovi lahust läbiva valguse intensiivsust ja võrdleb seda valguse intensiivsusega enne proovi läbimist. Küvett on spetsiaalne klaasist või kvartsist ristkülikukujuline anum, mis täidetakse analüüsitava lahusega ja asetatakse seadmesse, kus valguslaineid lastakse selle läbi. Spektrofotomeetri põhikomponentideks on valgusallikas, monokromaator (difraktsioonivõre või prisma) kitsa lainepikkuse riba eraldamiseks valgusallika spektrist, proovihoidik ehk küvett ja valgustundlik detektor (39).



Joonis 9. Spektrofotomeetri skemaatiline diagramm (36)

Ultraviolet- ja nähtava valguse spektrofotomeetria kasutab valgust elektromagnetilise kiirguse spektri ultravioletvahemikus (180-390 nm) ja nähtavas piirkonnas (380-780 nm) (36).

Kui ühendi molekul neelab valgusosakesi ehk elektromagnetkiirguse footoneid, liiguvad valentselektronid molekuli sees ühelt orbitaalilt teisele, mille tulemusena energia suureneb ja molekul läheb ergastatud olekusse. Neeldumine on võimalik vaid siis, kui footoni energia ehk neeldunud kiirgus on võrdne madalama ja kõrgema elektronilise energiataseme energiavahega. Funktsionaalrühmi, mis neelavad kiirgust nähtavas ja UV-piirkonnas, nimetatakse kromofoorideks. Mõne kromofoori maksimaalsed neeldumislainepikkused: benseen 255 nm, amiin 195 nm ja aldehüüd 210 nm (38).

Lahust läbiva valguse teatud energia hulk kvantifitseeritakse läbilaskvusena ( $T$ ). Läbilaskvus arvutatakse keemilisest proovist ( $I$ ) väljuva valguse intensiivsuse ehk hulga ja keemilise proovi siseneva valguse intensiivsuse suhtega ( $I_0$ ):

$$T = \frac{I}{I_0}, \quad (1)$$

Neelduvus ehk absorptsioon ( $A$ ) viitab footonite arvule, mille neelduvad lahuses olevad komponendimolekulid, ja see arvutatakse läbilaskvuse väärtuse negatiivse logaritmina (39).

$$A = -\log T, \quad (2)$$

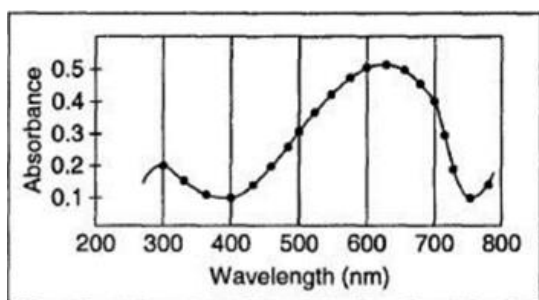
Kui valgust ei neeldu, siis  $I = I_0$  ja  $A = 0$ . Kui 90% valgusest neeldub, siis 10% sellest valgusest läbib proovi ja  $I = I_0/10$ ,  $A = 1$ . Kui läbib ainult 1% valgusest, siis  $A = 2$  (36).

Kasutades neelduvusi, määratakse tundmatu komponendi kontsentratsioon proovilahuses. Lambert-Beer'i seadus ütleb, et antud lainepikkusel neeldunud valguse hulk peab olema võrdeline lahuse kontsentratsiooniga. Lambert-Beer'i seaduse valem näeb välja nii:

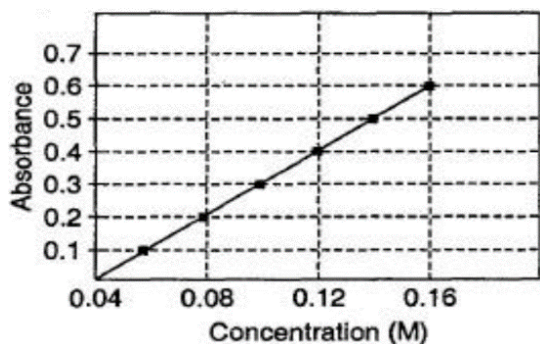
$$A = \varepsilon Cl, \quad (3)$$

kus  $A$  - absorptsioon (ühikuta suurus),  $\varepsilon$  - neeldumiskoeffitsient ( $l/\text{mol} \cdot \text{cm}$ ),  $C$  - lahuse molaarne kontsentratsioon ( $\text{mol}/l$ ),  $l$  - küveti läbimõõt ( $\text{cm}$ ) (39).

Erinevad komponendid neelavad vastavalt erinevatel lainepikkustel valgust, neil on iseloomulikud neeldumisspektrid. Spektri põhjal määratakse maksimaalse neeldumise lainepikkus ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Joonisel 10 on näidisedena broomkresoolroheline neeldumisspekter nähtava valguse vahemikus, mille neeldumismaksimum on ligikaudu 616 nm juures (39).



Joonis 10. Broomkresoolroheline neeldumisspekter (39)



Joonis 11. Broomkresoolroheline kalibreerimiskõver (39)

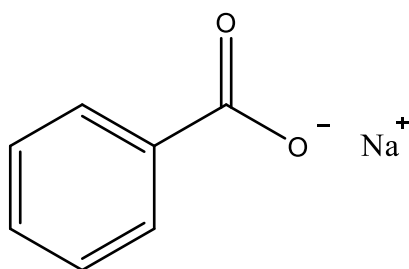
Kalibreerimiskõvera meetodi järgi uuritava ühendi kontsentratsiooni määramiseks tuleb esmalt mõõta neelduvust (A) võrdlusaluse suhtes, mis ei sisalda proovi, vaid ainult solventi. Ja seejärel mõõta neelduvused identses küvetis vähemalt kolmele teadaoleva kontsentratsiooniga standardlahusele kasutades sama solventi ja joonistada kalibreerimiskõver (joonis 11). Lahuste kontsentratsioonid tuleb valida nii, et neeldumine ei ületaks 2, kuna see võib mõjutada kõvera lineaarsust, täpsemad tulemused saab väärtustel  $A = 0,4-1,0$  (39).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Kasutatud säilitusainete iseloomustus

Bensoe- ja sorbiinhapetel on päris madalad lahustuvused vees (0,29 g/100 ml ja 0,16 g/100 ml 20°C juures vastavalt) ja sellepärast kasutatakse jookides nende soolasid - bensoaate ja sorbaate.

#### Naatriumbensoaat



Joonis 12. Naatriumbensoadi struktuur

Valem:  $C_7H_5NaO_2$

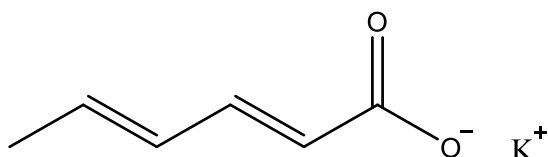
Molekulmass: 144.1 g/mol

Kirjeldus: valge kristalne pulber

E-number: E211

Lahustuvus vees (20°C): 62,81 g/100 ml

Kaaliumsorbaat



Joonis 13. Kaaliumsorbaadi struktuur

Valem:  $C_6H_7KO_2$

Molekulmass: 150.2 g/mol

Kirjeldus: kristalsed valged graanulid

E-number: E202

Lahustuvus vees (20°C): 58,2 g/100 ml

## 2.2. Uuritud joogid ja nende iseloomustus

Kokku uurimistöö raames analüüsiti 5 erineva Eestis tuntud tootja karastusjooki, millest etiketi järgi vaid üks ei sisaldanud naatriumbensoaati. Kõik joogid osteti Maxima poest plastpudelites ning hoiti külmkapis.

1. Kanes - gaseeritud karastusjook, virsiku-pirnimaitseline. Tootja: A. Le Coq, Eesti. Sisaldab ainult kaaliumsorbaati (E202).
2. Valge Klaar - gaseeritud karastusjook, õunamaitseline. Tootja: A. Le Coq, Eesti. Sisaldab naatriumbensoaati (E211) ja kaaliumsorbaati (E202).
3. Enjoy - gaseeritud karastusjook, sidruni-piparmündi-maasikamaitseline. Tootja: SIA „CIDO CRUPA“, Läti. Sisaldab naatriumbensoaati (E211) ja kaaliumsorbaati (E202).
4. Mountain Dew - gaseeritud karastusjook, sidrunimaitseline. Maaletootja: Royal Unibrew Eesti OÜ, kaubamärk: PepsiCo. Sisaldab ainult kaaliumsorbaati (E202).
5. Active - mahlasisaldav karastusjook, õuna-vaarikamaitseline. Tootja: A. Le Coq, Eesti. Sisaldab naatriumbensoaati (E211) ja kaaliumsorbaati (E202).

## 2.3. Kasutatud reagentid ja aparatuur

Kemikaalid ja reagentid:

- 1) naatriumbensoaat(>99.8%), Lach-Ner

- 2) kaaliumsorbaat (saadud TalTech toiduainete instituudi laborist)
- 3) Milli-Q vesi
- 4) Metanool for HPLC ( $\geq 99.9\%$ ), Honeywell

#### Aparatuur ja seadmed

Kromatograafiline analüüs viidi läbi kasutades HPLC süsteemi Agilent Technologies 1200 Series diodmaatriks-detektoriga, mis on väga tundlik lainepikkuste vahemikus 190–950 nm ja kasutab valgusallikatena deuterium ja wolframihõõglampe; Knauer 64 pumba ning Rheodyne 8125 dosaatoriga. Seadme juhtimiseks ja andmetöötluseks kasutati Agilent ChemStation-i tarkvara.

Spektrofotomeetriliste mõõtmiste jaoks kasutati Shimadzu UV-1280 UV-Vis spektrofotomeetrit ning kvartsküvette. Seade võimaldas teostada kvantitatiivset analüüsi lainepikkuste vahemikus 190-1100 nm. See omab ühekiirelist optilist süsteemi, valgusallikatena kasutab halogeen ja deuterium lampe, monokromaatorina holograafilist võre ning detektorina silikoon fotodiodi.

## **2.4. Spektrofotomeetiline säilitusainete analüüs**

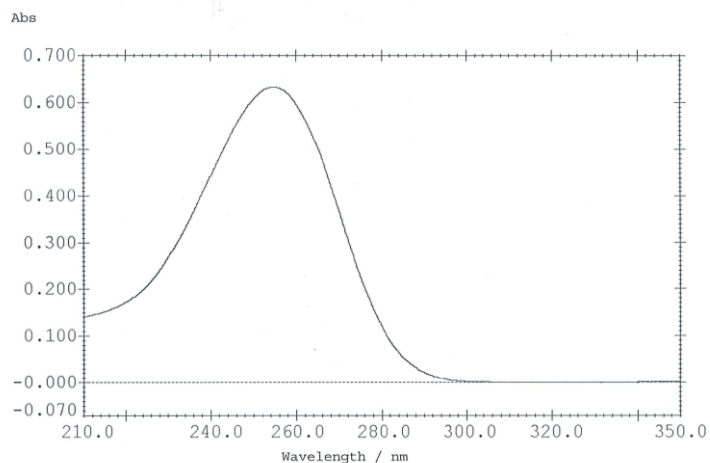
### **2.4.1 Standardlahuste ettevalmistamine**

UV-Vis spektrofotomeetrilise meetodi esimese sammuna valmistati erinevate kontsentratsioonidega Na-bensoaadi ja Ka-sorbaadi standardlahused. Et vastaks 100 mg bensoe- ja sorbiinhapetele kaaluti 118 mg naatriumbensoaati ja 134 mg kaaliumsorbaati ning mõlemad lahustati 100 ml vees. Saadud lahustest tehti 10x vahelahjendused ehk 100 mg/l. Edasi võeti sellest 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml ja 0,3 ml ja lahjendati veega 10 ml mahuga mõõtkolvidesse, et saada standardlahused vastavate kontsentratsioonidega 0,1, 0,5, 1, 2, 3 mg/l iga säilitusaine kohta. Kõigi lahjenduste jaoks ning võrdluslahusena kasutati kõrge puhtusastmega Milli-Q vett.

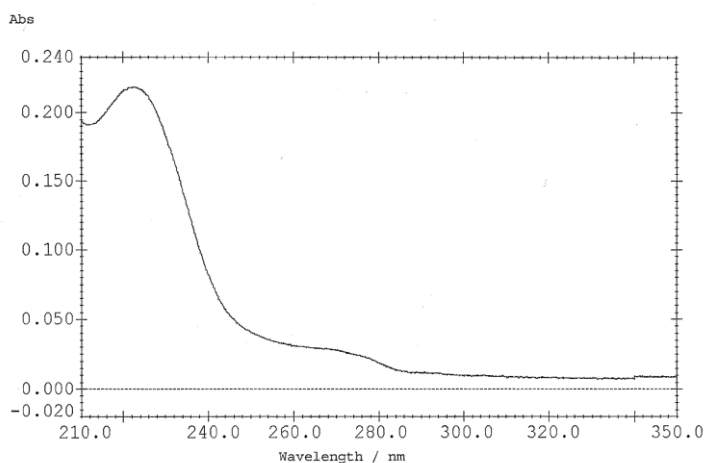
### **2.4.2 Absorptsiooni mõõtmine**

5 erinevate kontsentratsioonidega lahused viidi spektrofotomeetrisse absorptsiooni mõõtmiseks skaneerimisvahemikus 210 - 350 nm. Joonistel 14 ja 15 on toodud 3 mg/l standardlahuste neeldumisspektrite näited, kust saab määrata kõrgeima neelduvusega lainepikkust ehk neeldumismaksimumi. Ka-sorbaadi jaoks saadi neeldumismaksimum 254 nm juures ja naatriumbensoaadi jaoks 224 nm juures, kuid ainete neelduvusi registreeriti mõlemal lainepikkusel.





Joonis 14. 3 mg/l Ka-sorbaadi neeldumisspekter



Joonis 15. 3 mg/l Na-bensoaadi neeldumisspekter

#### 2.4.3 Proovide ettevalmistamine

Igast joogist võeti 0,2 ml ja lahjendati 10 ml mõõtkolvidesse Milli-Q veega. Kõik proovid degaseeriti ultrahelivannis. Kuna Active mahlajook oli hägune, filtreeriti see läbi PVDF 0,45 µm filtri. Iga prooviga teostati kolm paralleelkatset.

#### 2.4.4 Kalibreerimiskõverate joonistamine

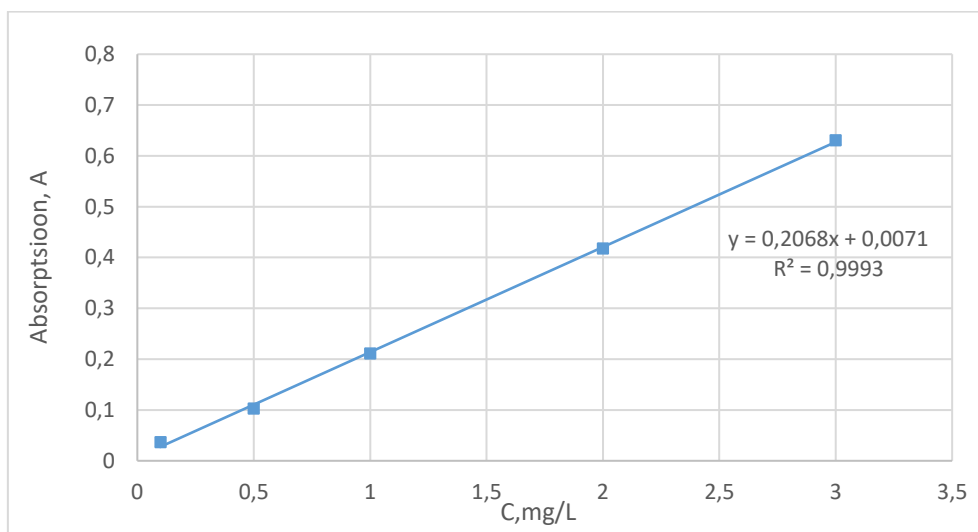
Pärast absorptsiooni mõõtmist saadud A väärtuste põhjal joonistati kalibreerimiskõverad (joonised 16 ja 17), kus y-teljel on absorptsioon ja x-teljel on standardlahuste kontsentratsioonid. Kalibreerimiskõver koostati kolme paralleelkatse tulemustest arvutatud aritmeetiliste keskväärtuste alusel.

Tabel 1. Ka-sorbaadi standardlahuste neelduvuste aritmeetilised keskmised

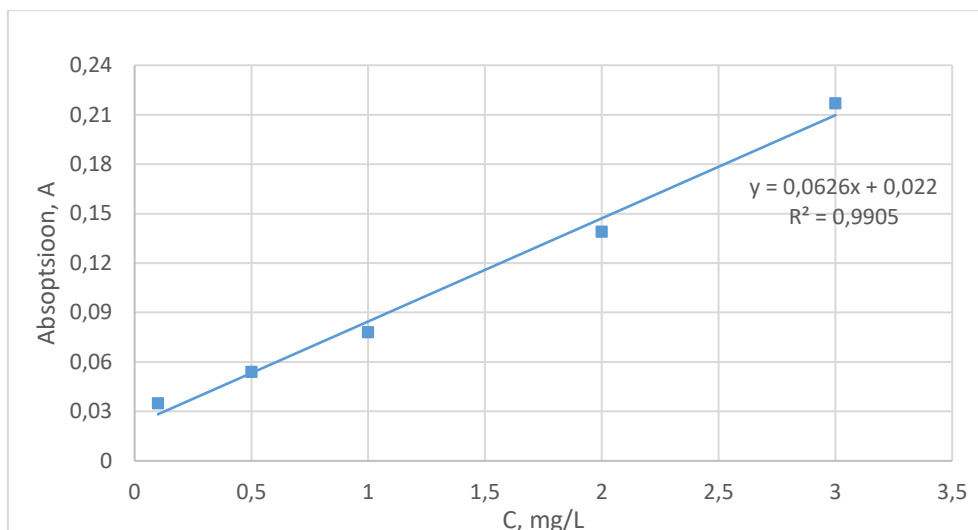
<b>C, mg/l</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Neelduvus (A)</b>	0,036	0,103	0,210	0,412	0,628
	0,036	0,103	0,211	0,420	0,632
	0,039	0,103	0,211	0,421	0,633
<b>Keskväärtus, <math>\bar{x}</math></b>	0,037	0,103	0,211	0,418	0,631

Tabel 2. Na-bensoaadi standardlahuste neelduvuste (224 nm) aritmeetilised keskmised

<b>C, mg/l</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Neelduvus (A)</b>	0,037	0,057	0,080	0,137	0,217
	0,034	0,053	0,078	0,141	0,218
	0,033	0,052	0,077	0,140	0,215
<b>Keskväärtus, <math>\bar{x}</math></b>	0,035	0,054	0,078	0,139	0,217



Joonis 16. Ka-sorbaadi kalibreerimiskõver 254 nm juures.



Joonis 17. Na-bensoaadi kalibreerimiskõver 224 nm juures.

## 2.5. Säilitusainete analüüs pööratud faasi HPLC meetodil

### 2.5.1 Analüüsitingimused

Pööratud faasi HPLC kasutati bensoaadi ja sorbaadi kvantitatiivseks analüüsiks. Ühendite eraldamine viidi läbi Supelco Discovery HS C-18 (15 cm x 4,6 mm, 5 $\mu$ ) kolonniga koos sobiva eelkolonniga proovi ruumalaga 20  $\mu$ l, rõhuga 6-7 MPa ja läbivooluajaga 15 minutit. Voolukiirus määrati 0,2 ml/min, kuna suurema kiiruse korral rõhk tõusis üle piiri (10 MPa) ja ilmusid rõhukõikumised. Liikuvaks faasiks kasutati pööratud faasi-kromatograafia jaoks hästi sobivat metanooli (100%).

### 2.5.2 Eluendi valimine

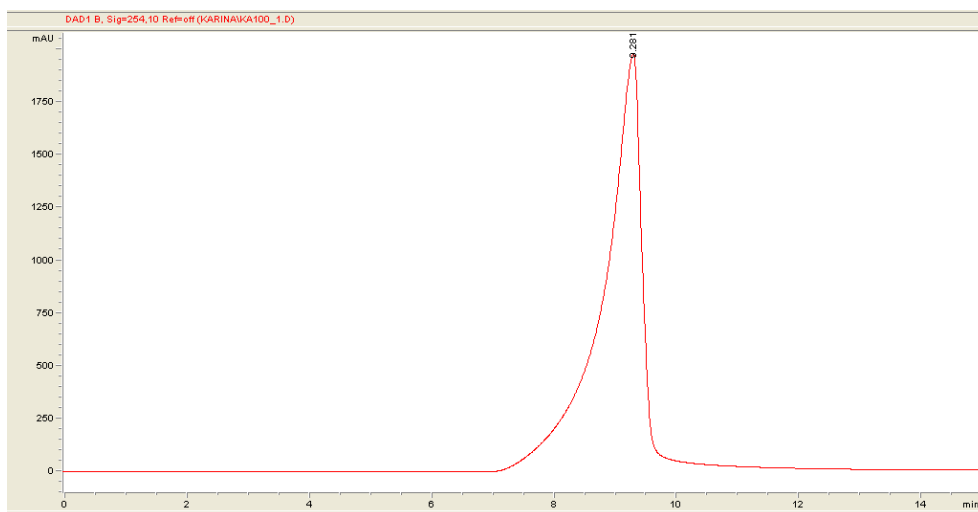
Töös prooviti eluendina kasutada mitmeid variante nagu 70:30% v/v (0,1 M naatriumatsetaat:metanool) ja 25:75% v/v (20 mM ammooniumatsetaat puhver:metanool). Esimese eluendiga tekkisid negatiivsed piigid, esines palju süsteempikke ning baasjoon oli mürane (vt Lisa 1). Ammooniumatsetaat:metanool eluendiga ei leitud piikide kasvu standardlahuste kontsentratsiooni suurenemisega. Asendades eluendi puhta metanooliga saadi kitsad ilusad piigid.

### 2.5.3 Standardlahuste ettevalmistamine

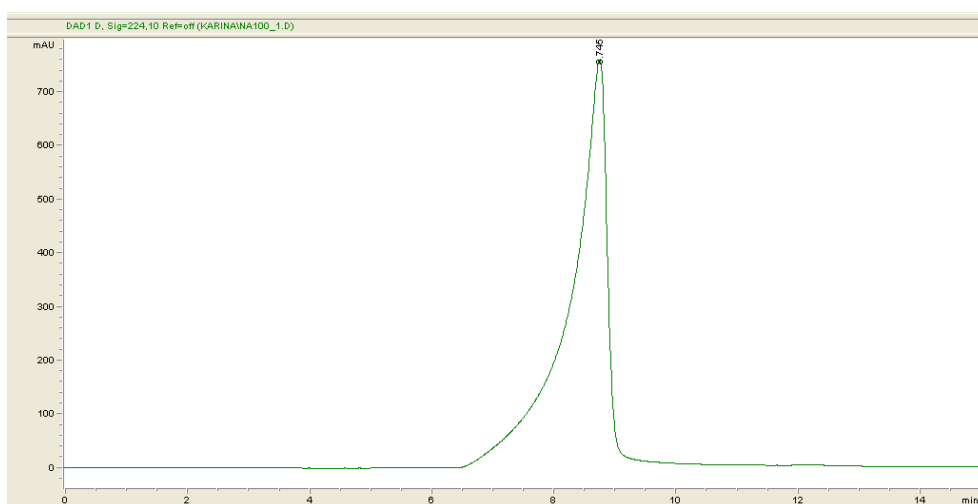
Kõigepealt võeti 10 mg Na-bensoaati ja Ka-sorbaati 10 ml mõõtkolvidesse ja täideti metanooliga kriipsuni, et saada 1000 mg/l. 10 ml mõõtkolvidesse võeti 1000 mg/l lahusest 0,3-1 ml ja lahjendati 10 ml-ni metanooliga. Mõlemate säilitusainete standardlahuste kontsentratsioonid olid 10, 30, 50, 80 ja 100 mg/l.

### 2.5.4 Kalibreerimiskõverate joonistamine

Standardlahuste mõõtmised teostati UV-Vis spektrofotomeetrias määratud naatriumbensoaadi ja kaaliumsorbaadi neeldumismaksimumite lainepikkustel 224 nm 254 nm vastavalt. Päril lähedased retentsiooniajad leiti naatriumbensoaadi jaoks 8,7 min ja kaaliumsorbaadi jaoks 9,2 min peal. Joonised 18 ja 19 näitavad bensoaadi ja sorbaadi 100 mg/l standardlahustest saadud kromatogrammide graafikud, kus x-teljel on retentsiooni aeg minutites ja y-teljel on neelduvus mAU ühikutes.



Joonis 18. Ka-sorbaadi 100 mg/l standardlahuse kromatogramm detekteerimislainepikkusel 254 nm



Joonis 19. Na-bensoaadi 100 mg/l standardlahuse kromatogramm detekteerimislainepikkusel 224 nm

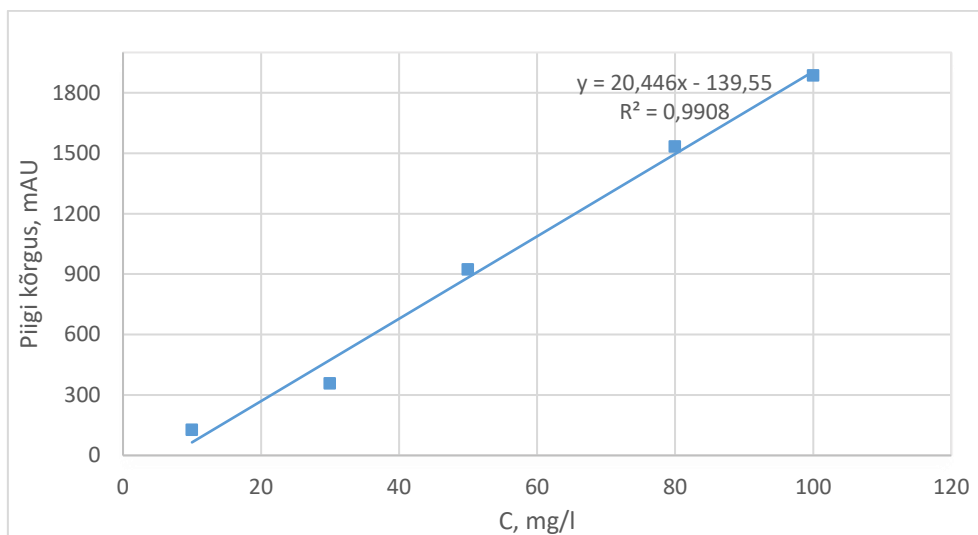
Bensoaadi- ja sorbaadi kalibreerimiskõverad koostati piigi kõrguse (mAU) ja lahuse kontsentratsiooni (mg/l) andmete alusel (joonised 20 ja 21). Kolmest paralleelkatses registreeritud kõrguste jaoks arvutati aritmeetilised keskmised (tabelid 3 ja 4). Arvutatud andmete põhjal joonistati graafikud lisades saadud väärtused y-teljele vastavalt kontsentratsioonidele x-teljel.

Tabel 3. Ka-sorbaadi standardlahuste piikide kõrgused ja nende aritmeetilised keskmised

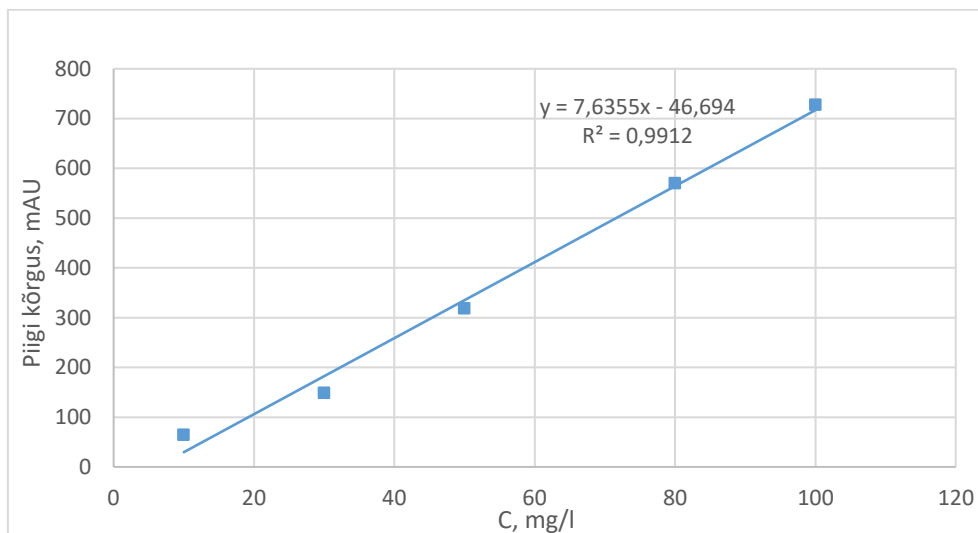
<i>C</i> , mg/l	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>50</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Piigi kõrgus, mAU</b>	132,4	378	892,4	1543,9	1956,9
	125,2	341,2	945,9	1540,9	1805,6
	122,3	351	925,6	1512,1	1895,1
<b>Keskväärus, <math>\bar{x}</math></b>	126,6	356,7	921,3	1532,3	1885,9

Tabel 4. Na-bensoaadi standardlahuste piikide kõrgused ja nende aritmeetilised keskmised

<i>C</i> , mg/l	10	30	50	80	100
<i>Piigi kõrgus</i> , mAU	73,7	135,1	300,6	537,1	757,4
	68,1	148,2	318,1	564,2	665,5
	50,5	161,8	336,1	608,8	758,9
<i>Keskväärus</i> , $\bar{x}$	64,1	148,4	318,3	570	727,3



Joonis 20. Ka-sorbaadi kalibreerimiskõver 254 nm juures



Joonis 21. Na-bensoaadi kalibreerimiskõver 224 nm juures

### 2.5.5 Proovide ettevalmistamine

Kanes, Valge Klaar, Enjoy ja Mountain Dew jookidest bensoatide ja sorbaatide ekstraheerimiseks võeti 10 ml igast joogist 25 ml Falcon tsentrifuugiklaasidesse ja degaseeriti. Active mahlajooki filtreeriti läbi 0,45 PVDF membraanfiltrit hädususe kõrvaldamiseks. 1 ml igast proovist segati 1 ml

metanooliga. Enne kolonni süstimist filtreeriti kõik proovid läbi 0,2 µm PTFE membraanfiltritri. Iga prooviga tehti vähemalt 3 korduskatset.

## 2.6 Katseandmete statistiline töötlus

Katseandmete statistiliseks analüüsiks mõlema meetodi puhul arvutati kõigile saadud katsetulemustele (s.h neelduvused ja piikide kõrgused) keskvärtused, kasutades järgmist valemit:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (4)$$

kus  $\bar{x}$  - mõõdetava suuruse keskvärtus,  $x_i$  - mõõdetava suuruse üksikvärtus ja  $n$  - mõõtmiste arv.

Lähtudes keskvärtustest, arvutati ka standardhälbed, et hinnata mõõtetulemuste täpsust ehk kui palju saadud üksikvärtused erinevad aritmeetilisest keskmisest. Standardhälve arvutati valemi (5) järgi:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (5)$$

kus  $S$  - mõõdetavate suuruste standardhälve, ja  $n-1$  - vabadusastmete arv,  $n$  - paralleelkatsete arv.

## 3. Tulemused ja nende arutelu

### 3.1 Spektrofotomeetriliste tulemuste töötlemine

#### 3.1.1 Kalibreerimiskõvera meetod

Kaks standardite kalibreerimiskõverat on esitatud joonistel 16 ja 17. Regressiooni võrrandid, mis saadud lainepikkustel 254 nm ja 224 nm kalibreerimiskõveratest näitasid head lineaarsust standardlahuste kontsentratsioonide vahemikus 0,1-3 mg/l. Analüütide kontsentratsioonid proovides arvutati regressiooni võrrandi abil:

$$Y = aX + b, \quad (6)$$

kus  $Y$  - mõõdetud absorptsioon,  $a$  - regressioonikordaja,  $b$  - konstant ja  $X$  - aine teadmata kontsentratsioon.

Regressiooni võrrandid on Ka-sorbaadi jaoks  $y = 0,2068x + 0,0071$  ja Na-sorbaadi jaoks  $y = 0,0626x + 0,022$ . Korrelatsioonikoefitsiendi ruut näitas hea lineaarse seose tugevust Ka-sorbaadi korral ( $R^2=0,9993$ ), aga veidi vähema Na-bensoaadi jaoks ( $R^2=0,9905$ ). Uuritavate proovide absorptsioonide aritmeetilised keskmised  $\bar{A}$  ja standardhälbed  $\pm SD$  kolmest paralleelkatsest ( $n=3$ ) arvutati kasutades valemeid (4) ja (5). Standardide ettevalmistamisel võeti analüütide kaalutised vastavalt sorbiin- ja bensoehapetele, sellepärast ei olnud enam vaja piirnormidega võrdlemiseks ümber arvutada. Kuna mõõtmised teostati proovide 50x lahjendustega, siis tabelis 5 on toodud hapete keskmised kontsentratsioonid  $C$  (mg/l) uuritud karastusjookides korrutatud 50-ga. Täpsemad arvutused on toodud Lisas 2.

Tabel 5. Spektrofotomeetrilise meetodi esialgsed mõõtmis- ja arvutustulemused

	<i>Bensoehape</i>			<i>Sorbiinhape</i>		
	$\bar{A}$	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l	$\bar{A}$	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l
<i>Doctor Active</i>	0,417	307,9	6,2	0,725	171,9	1,7
<i>Kanes</i>	0,330	246,3	0,5	0,577	137,9	0,1
<i>Valge Klaar</i>	0,370	278,0	0,8	0,739	176,9	0,1
<i>Mountain Dew</i>	0,246	179,2	0,5	0,644	154,1	0,1
<i>Enjoy</i>	0,396	298,7	0,8	0,686	164,1	0,2

Vastavalt saadud arvutustele naatriumbensoadi ehk bensoehappe kontsentratsioon karastusjookides on vahemikus  $179,2 \pm 0,5$  mg/l kuni  $307,9 \pm 6,2$  mg/l ja kaaliumsorbaadi ehk sorbiinhappe kontsentratsioon on vahemikus  $137,9 \pm 0,1$  mg/l kuni  $176,9 \pm 0,1$  mg/l. Saadud tulemused on kahtlased, kuna paljude jookide bensoehappe kontsentratsioonid ületavad lubatud piiri kaks korda.

### 3.1.2 Teise arvutusmeetodi kasutamine

Kuna joogid sisaldavad mõlemat valgust neelavat komponenti, ei õnnestunud neid eraldi määrata kasutades nende neeldumismaksimume ja kalibreerimisgraafikut. Tõenäoliselt ebatäpset tulemust põhjustab nende neeldumisspektrite kattumine üksteisega, hoolimata neeldumismaksimumide leidmisest erinevatel lainepikkustel. Võttes arvesse komponentide mõju üksteisele, koostati bensoe- ja sorbiinhapete segude jaoks võrrandisüsteem (40):

$$\begin{aligned} A_{\lambda_1} &= l(\varepsilon_{A,\lambda_1} C_A + \varepsilon_{B,\lambda_1} C_B); \\ A_{\lambda_2} &= l(\varepsilon_{A,\lambda_2} C_A + \varepsilon_{B,\lambda_2} C_B). \end{aligned} \quad (7)$$

Kuna küveti läbimõõt  $l=1$  cm, siis kontsentratsioonid avaldatakse nii:

$$\begin{aligned} C_A &= \frac{(A_{\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - A_{\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1})}{(\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1})}; \\ C_B &= \frac{(A_{\lambda_2} \varepsilon_{A,\lambda_1} - A_{\lambda_1} \varepsilon_{A,\lambda_2})}{(\varepsilon_{A,\lambda_1} \varepsilon_{B,\lambda_2} - \varepsilon_{A,\lambda_2} \varepsilon_{B,\lambda_1})}. \end{aligned} \quad (8)$$

kus  $C_A$  - bensoehappe kontsentratsioon,  $C_B$  – sorbiinhappe kontsentratsioon,  $\lambda_1$  – 224 nm,  $\lambda_2$  – 254 nm,  $\varepsilon_A$  ja  $\varepsilon_B$  – ainete neeldumiskoeffitsiendid kindlatel lainepikkustel.

Neeldumiskoeffitsientide arvutused kasutades valemeid 7 ja 8 ja kontsentratsioonide arvutused on toodud Lisas 3. Ka-sorbaadi neeldumiskoeffitsiendi keskmise arvutustest on jäetud välja 0,1 mg/l kontsentratsiooni andmed ja Na-sorbaadi 0,1 ja 0,5 mg/l, kuna need erinevad liiga palju teistest saadud  $\varepsilon$  väärtustest.

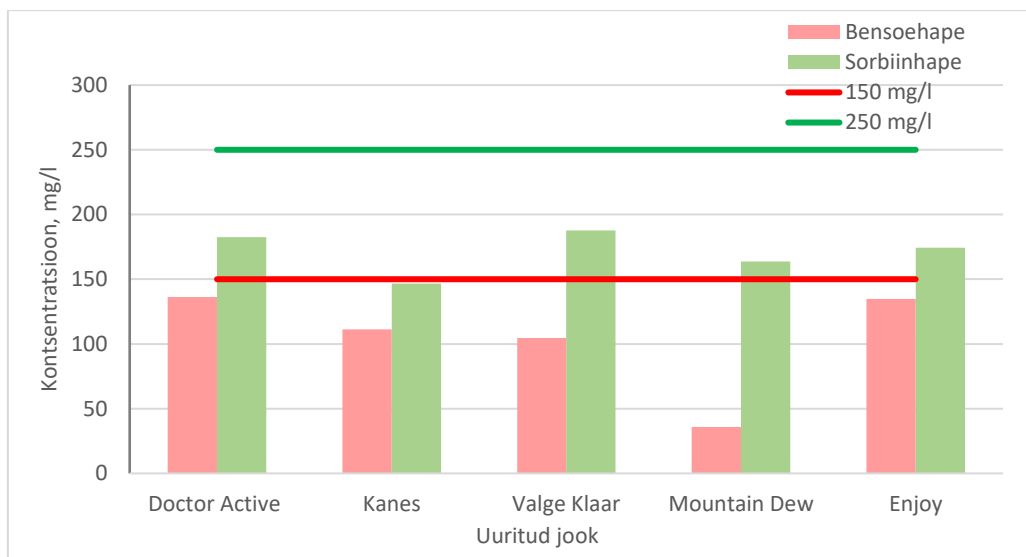
Tabel 6. Spektrofotomeetrilise meetodi mõõtmis- ja arvutustulemused

	<i>Bensoehape</i>		<i>Sorbiinhape</i>	
	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l
<i>Doctor Active</i>	136,2	4,1	182,4	1,8
<i>Kanes</i>	111,4	0,3	146,7	0,2
<i>Valge Klaar</i>	104,5	0,6	187,6	0,2
<i>Mountain Dew</i>	35,9	0,3	163,7	0,2
<i>Enjoy</i>	134,9	0,5	174,3	0,3

Tähistused tabelis on samad, mis kirjeldati punktis 3.1.1. Selle meetodi arvutuste põhjal saab oletada, et saadud tulemused on nüüd usaldusväärsemad. Sorbiinhappe sisaldus palju ei muutunud, kuid bensoehappe kontsentratsioon vähenes üle kahe korra.

Mõlemad säilitusained tuvastati spektrofotomeetrilisel meetodil kõigis uuritavates jookides. Kuigi Mountain Dew ja Kanes etiketil väideti, et jook peab sisaldama ainult ühte säilitusainet – kaaliumsorbaati, katsete tulemused näitasid, et nendes sisaldub ka naatriumbensoaat. Tabelist 6 on näha, et Mountain Dew joogis on palju vähem bensoehapet, kui teistes. Teades, et seda ei tohiks seal üldse sisalduda, saab oletada, et saadud hulk võiks olla mõõtevigaga. Ka-sorbaati leidub kõigis viies uuritud karastusjoogis suurema kontsentratsiooniga, kui bensoaati. Naatriumbensoaadi ehk bensoehappe kontsentratsioon karastusjookides on vahemikus  $35,9 \pm 0,3$  mg/l kuni  $136,2 \pm 4,1$  mg/l. Kaaliumsorbaadi ehk sorbiinhappe kontsentratsiooni saadi vahemikus  $146,7 \pm 0,2$  mg/l kuni  $187,6 \pm 0,2$  mg/l. Joonis 22 näitab säilitusainete spektrofotomeetriliselt saadud sisalduse võrdlust uuritud karastusjookide proovides piirnormidega. EL-i seaduste poolt lubatud piirnormid määratleti sorbiinhappe jaoks 300 mg/l, aga 250 mg/l, kui seda kasutatakse koos bensoehappega. Kuna läbiviidud analüüs näitas, et bensoehape sisaldub kõigis jookides, siis kasutati võrdlemiseks ikkagi 250 mg/l. Bensoehappe jaoks ohutuks kontsentratsiooniks otsustati kuni 150 mg/l. Joonisel 22 punane joon näitab bensoehappe ja roheline sorbiinhappe lubatud piirnorme. Sealt on näha, et uuritud ainete sisaldused kõigis analüüsitud joogiproovides jäävad lubatud piirmäära alla.



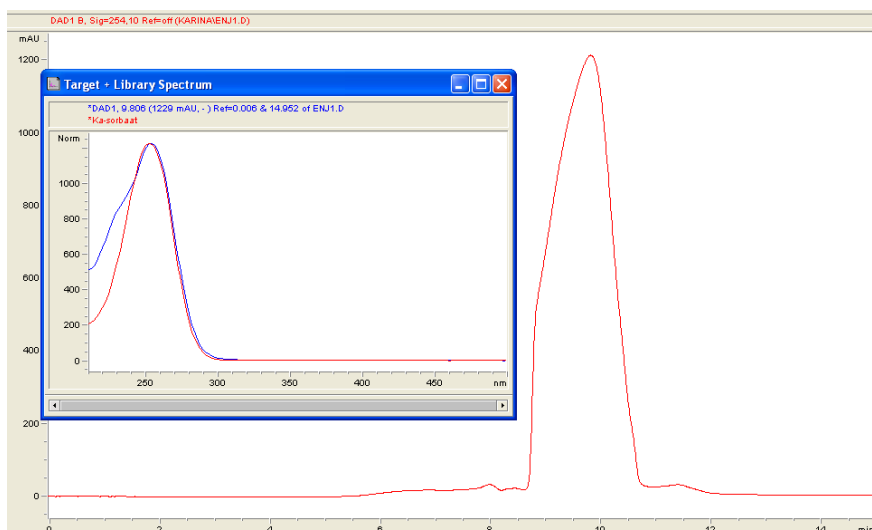


Joonis 22. Bensoehappe (helepunane veerg) ja sorbiinhappe (heleroheline veerg) kontsentratsioonide võrdlus uuritud karastusjookides. Punane ja roheline jooned näitavad vastavalt bensoe- ja sorbiinhapete lubatud piirnorme

### 3.2 Kromatograafia tulemuste töötlemine

Sorbiinhappe ja bensoehappe tuvastamiseks pööratud faasi-kromatograafilisel meetodil võrreldi proovide kromatogramme standardlahuste omadega. Kromatogramme interpreteerimiseks kõigepealt piike integreeritakse. ChemStation tarkvara võimaldab registreerida piikide pindala, kõrguse ja retentsiooniaja parameetreid. Tarkvara abil analüüsiti proovide piike, võrreldes ka spektrite andmebaasi kogutud ühendite neeldumisspektritega. Selleks saadud standardlahustest piikide spektrid kanti andmebaasi ja pärast tuvastati ained sarnasuse järgi. Naatriumbensoaadi ja kaaliumsorbaadi HPLC analüüsi teostati lainepikkustel vastavalt 224 nm ja 254 nm.

Käesolevas töös proovide analüüsil ja ühendite identifitseerimiseks kasutati retentsiooniaegu ja piikide kõrguseid. Esiialgu teostati andmete töötlust piikide pindalade järgi. Katsetamise käigus selgus, et ühendite lahutamine jookide proovides ei toimu hästi. Na-bensoaadi piigid kaovad, toimub piikide kattumine, mistõttu pindalat on võimatu määrata. Selleks, et saada tulemust, prooviti leida ühendit, kasutades funktsiooni, mis annab valida spektrit mistahes ajahetkel leides selle abil piigi kõrgust. Kaaliumsorbaati sai neeldumisspektrite järgi tuvastada kõigis uuritud proovides, kuid naatriumbensoaati tuvastamine oli suhteliselt keeruline. Ka-sorbaadi piigid on eristavad ja klappivad hästi kokku võrdlusspektriga. Näide on toodud joonisel 23, kust on näha, et neelduvusmaksimumi järgi spektrite andmebaas identifitseerib ainet sorbaadina. Bensoaati sai leida ülalmainitud funktsiooni abil, valides piigi lokaalselt teatud retentsioonijal. Kahjuks, mõlemat ainet kõigis jookides ja igas paralleelis leida ei õnnestunud. Kõige vähem andmeid saadi naatriumbensoaadiga (vt Lisa 4).



Joonis 13. Kaaliumsorbaadi identifitseerimine spektrite andmebaasi järgi Enjoy joogi proovis

Ainete kontsentratsiooni määramiseks loodi punktis 2.5 kaks standardite kalibreerimisgraafikut. Kontsentratsiooni arvutatakse samamoodi kui oli kirjeldatud punktis 3.1. Saadud regressiooni võrrandites asendatakse Y mõõdetud piigi kõrguse väärtusega ja avaldatakse X. Lineaarsust kirjeldav korrelatsioonikoefitsiendi ruut ( $R^2$ ) on sorbaadi jaoks 0,9908 ja bensoaadi jaoks 0,9912. Regressiooni võrrandid saadi kaaliumsorbaadi ja naatriumbensoaadi jaoks vastavalt  $y = 20,446x - 139,55$  ja  $y = 7,6355x - 46,694$ . Kuna mõõtmistel tehti 1:1 lahendus, kontsentratsioonid korrutatakse 2-ga. Saadud soolade kontsentratsioonid viiakse vastavusse hapetega jagades koefitsientidega 1,18 bensoehappe ja 1,34 sorbiinhappe jaoks. Tabelis 6 esimeses veerus on piikide kõrguste aritmeetilised keskmised ( $\bar{h}$ ), teises veerus ( $\bar{C}$ ) bensoe- ja sorbiinhapete kontsentratsioonid ja kolmandas on standardhälbed ( $\pm SD$ ) arvutatud kolmest paralleelkatsest ( $n=3$ ). Kuna mõnede proovidega saadi tulemust ainult ühest paralleelist, tühi lahter tabelis tähendab, et standardhälvet ei olnud võimalik arvutada. Lisas 4 on toodud kontsentratsiooni arvutused, kus punase värviga on märgitud välja jäetud andmed.

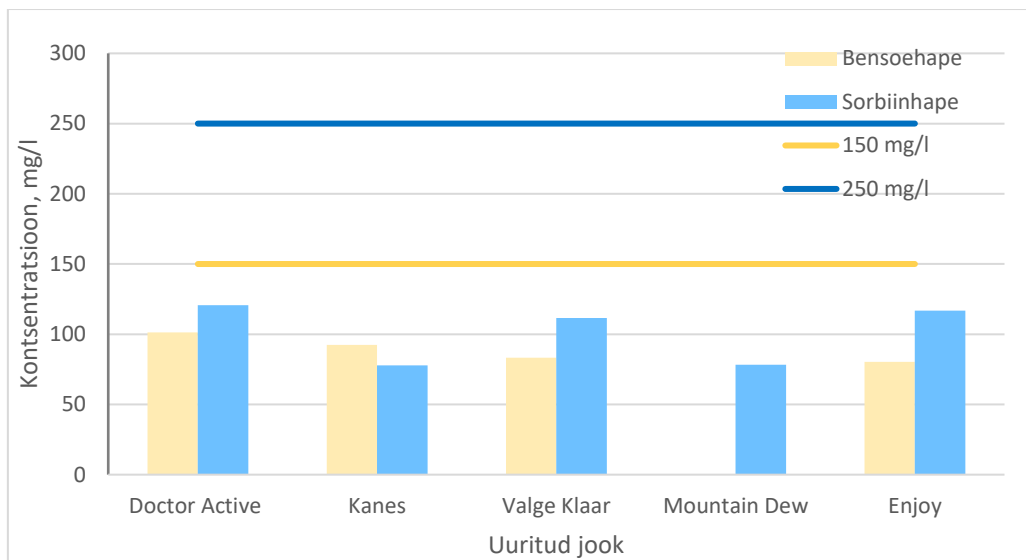
Tabel 6. HPLC meetodi mõõtmis- ja arvutustulemused

	<i>Bensoehape</i>			<i>Sorbiinhape</i>		
	$\bar{h}$ , mAU	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l	$\bar{h}$ , mAU	$\bar{C}$ , mg/l	$\pm SD$ , mg/l
<b>Doctor Active</b>	410	101,4		1514	120,7	
<b>Kanes</b>	369	92,3	1,3	927,3	77,9	6,9
<b>Valge Klaar</b>	328	83,2		1389	111,6	0,2
<b>Mountain Dew</b>	n.d.	n.d.	n.d.	931,7	78,2	8,9
<b>Enjoy</b>	315	80,3		1461,5	116,9	0,8

\*n.d. – ingl. k. not detected

Vastavalt saadud andmetele, tuvastati kromatograafia meetodit kasutades sorbiinhapet kõigis viies joogis, millest selle suurima kontsentratsiooni saadi Doctor Active mahlajoogis ja väikseima Mountain Dew-s. Bensoehapet ei tuvastatud üldse ainult Mountain Dew joogis, kuid sarnaselt

sorbiinahappegaga kõige rohkem seda sisaldab Doctor Active. Bensoehappe leitud kontsentratsioon on vahemikus „n.d.“ kuni 101,4 mg/l. Sorbiinhappe kontsentratsioon joogiproovides on vahemikus  $77,9 \pm 6,9$  mg/l kuni 120,7 mg/l. Joonis 23 näitab saadud säilitusainete sisaldused uuritud jookides võrreldes EL-i seaduses sätestatud piirnormidega. Sealt on näha, et mõlemate säilitusainete kontsentratsioonid kõigis jookides ei ületa lubatud piiri.



Joonis 23. Bensoehappe (helekollane veerg) ja sorbiinhappe (helesinine veerg) kontsentratsioonide võrdlus uuritud karastusjookides. Kollane ja sinine jooned näitavad vastavalt bensoe- ja sorbiinhapete lubatud piirnorme

### 3.4 Varasemate uuringute tulemused

2015. aastal Iraanis kõrgsurvevedelikkromatograafia meetodil läbi viidud kaaliumsorbaadi ja naatriumbensoaadi uuring (37) näitas naatriumbensoaadi sisaldust kolmes erinevat marki karastusjoogis vahemikus 83,2-125,0 mg/kg, kaaliumsorbaat sisaldus vaid ühes proovis ja kogus oli  $68,5 \pm 5,6$  mg/kg. Teine uuring viidi läbi UV-Vis spektrofotomeetrilise analüüsiga Nigeerias (28), kus analüüsiti 20 karastusjooki, millest 10 olid gaseeritud karastusjoogid ja 10 puuviljamahlad. Uuringu tulemused näitasid bensoaadi ja sorbaadi kontsentratsiooni karastusjookides vastavalt 14,25-218,32 mg/l ja 2,22-158 mg/l. Puuviljamahlad sisaldasid bensoaati 25,80-245,10 mg/l ja sorbaati 1,36-85,54 mg/l. Võrreldes nendest uuringutest saadud tulemusi EL-i piirnormidega, sorbaatide kontsentratsioonid jäid normi piiresse, kuid bensoaatide puhul ületati lubatud kontsentratsioon.

### 3.3 Hinnang kasutatud meetoditele ja võrdlus

Tabel 7. UV-Vis spektrofotomeetria ja kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) meetoditel saadud säilitusainete kontsentratsioonid

	<i>Bensoehape</i> <i>C, mg/l ± SD</i>		<i>Sorbiinhape</i> <i>C, mg/l ± SD</i>	
	<i>UV-Vis</i>	<i>HPLC</i>	<i>UV-Vis</i>	<i>HPLC</i>
<b>Doctor Active</b>	136,2 ± 4,1	101,4	182,4 ± 1,8	120,7
<b>Kanes</b>	111,4 ± 0,3	92,3 ± 1,3	146,7 ± 0,2	77,9 ± 6,9
<b>Valge Klaar</b>	104,5 ± 0,6	83,2	187,6 ± 0,2	111,6 ± 0,2
<b>Mountain Dew</b>	35,9 ± 0,3	n.d.	163,7 ± 0,2	78,2 ± 8,9
<b>Enjoy</b>	134,9 ± 0,5	80,3	174,3 ± 0,3	116,9 ± 0,8

Analüüsidest saadud andmeid on selge, et kaks kasutatavat kvantitatiivset analüüsimeetodit andsid küllaltki erinevaid tulemusi. Saadud andmed on toodud tabelis 7. Kui neid läbi vaadata, on näha, et kromatograafilisel meetodil saadud kontsentratsioonid on palju väiksemad, kui spektrofotomeetrialisel meetodil tuvastatud. Mõlema meetodiga saadi kõige vähem bensoehapet Mountain Dew-s. UV-Vis spektrofotomeetriaga saadi selles joogis kontsentratsioon  $35,9 \pm 0,3$  mg/l, mis on palju väiksem, kui teistes jookides ja HPLC-ga seda ei tuvastatud üldse. Lisaks sellele, joogi etiketil pole naatriumbensoaat kirjas, mis paneb mõtlema, et spektrofotomeetrialisel meetodil saadud kontsentratsioon võib olla mõõtmisviga. Aga Kanes joogis mõlemad meetodid näitasid naatriumbensoaadi sisaldust üsna suures kontsentratsioonis, mis ei vasta etiketil olevale teabele, kus oli märgitud ainult kaaliumsorbaat. Nii UV-Vis spektrofotomeetriaga, kui ka kõrgsurvevedelikkromatograafial saadud bensoe- ja sorbiinhapete kontsentratsioonid kõigis uuritavates jookides ei ületa Euroopa Liidu seadustega määratud sisalduse piirnorme.

Võttes arvesse katsete läbiviimise protsessi ja standardhälbeid, mis iseloomustavad meetodi täpsust ja reprodutseeritavust, võib väita, et spektrofotomeetria meetod osutus lihtsamaks ja usaldusväärsemaks. UV-Vis meetodiga analüüsi läbiviimine läks kiiremini, kui HPLC-ga. Kõik paralleelkatsed teostati edukalt esimesest korrast, eelvalmistamisest pidi tegema ainult lisalahjendusi, kuid pidi ka arvestama teiste komponentide mõju neeldumisspektrisse ehk valima õiget arvutusmeetodit. Kromatograafilise analüüsi teostamisel ei toimunud ühendite head eraldumist, mille pärast tekkisid raskused ainete määramisel ja identifitseerimisel. Valge Klaar ja Enjoy jookides bensoehapet ja Doctor Active-s mõlemat säilitusainet sai tuvastada ainult ühes paralleelis, sellepärast analüüsi reprodutseeritavust ei jõudnud saavutada ja hinnata. Kuid HPLC peab olema kiire, selektiivne ja usaldusväärne meetod, katsetamine võttis palju aega. Korralike tulemuste saamiseks prooviti leida optimaalseid tingimusi ja valida sobivat eluenti, aga ikkagi kõrget eraldusvõimet ei saavutatud. Baasjoon kromatogrammidel jäi müraseks. On võimalik, et eeltöötlus oli ebapiisav, kuna seda võisid mõjutada teised ühendid proovi maatriksis. Rõhku ei õnnestunud stabiliseerida. Selle kõikumise põhjuseks võis olla aparatuuri tehniline rike ja õhumullid süsteemis, kuigi eluendid ja proovid degaseeriti.

## 4. Kokkuvõte

Bensoehape ja sorbiinhape on tänu oma kõrgetele antimikroobsetele omadustele tõhusad säilitusained ning neid kasutatakse paljudes toiduainetes ja eriti sageli karastusjookides. Vees halva lahustuvuse tõttu kasutatakse jookides bensoe- ja sorbiinhappeid soolade kujul, peamiselt kaaliumsorbaadi ja naatriumbensoaadina. Säilitusaineid peetakse ohutuks ja EL-is kasutamiseks heaks kiidetud, kuid nende maksimaalne lubatud sisaldus on seadusega rangelt reguleeritud. Seega vastavalt II lisale (EÜ) nr 1333/2008 ei tohi bensoehappe ja bensoaatide sisaldus karastusjookides ületada 150 mg/l ning sorbiinhappe sisalduse lubatud piirmäär üksi on 300 mg/l ja 250 mg/l, kui kasutatakse koos bensoehappe või bensoaadiga.

Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas kauplustes riiulitel müüdavate jookide bensoe- ja sorbiinhapete sisaldus vastab seaduslikele normidele, samuti kas säilitusainete tegelik sisaldus vastab tootja poolt etiketile kirjutatule. Uuriti viit erinevat marki karastusjooke, millest kolm sisaldavad määrgistuse järgi mõlemat säilitusainet ja kaks ainult kaaliumsorbaati. Kvantitatiivse analüüsi läbiviimiseks valiti võrdluseks kaks meetodit – UV-Vis spektrofotomeetria ja HPLC ehk kõrgsurve vedelikkromatograafia.

Eksperimentaalselt saadud tulemused näitasid, et bensoe- ja sorbiinhapete sisaldus kõigis viies joogis ei ületa lubatud piiri. Spektrofotomeetriliste andmete vastavalt bensoehappe kontsentratsioonid on vahemikus  $35,9 \pm 0,3$  mg/l -  $136,2 \pm 4,1$  mg/l ja sorbiinhappe  $146,7 \pm 0,2$  mg/l -  $187,6 \pm 0,2$  mg/l. Kromatograafiliselt saadud bensoehappe kontsentratsioonid varieeruvad "ei tuvastatud" kuni 101,4 mg/l-ni ja sorbiinhappe kontsentratsioonid  $77,9 \pm 6,9$  kuni 120,7 mg/l-ni. Kahe joogi etiketid viitasid ainult sorbiinhappe sisaldusele koostises, mis ei vasta käesoleva töö analüüside tulemustele. Ühes neist jookidest kromatograafiliselt bensoehapet ei tuvastatud ning spektrofotomeetriselt saadud kontsentratsioon osutus kordades väiksemaks kui teistel jookidel, mistõttu eeldati, et saadud kogus võib olla tingitud mõõtmisveast.

Mõlemad meetodid andsid suhteliselt erinevaid tulemusi. Antud töös osutus spektrofotomeetiline meetod lihtsamaks ja kiiremaks. Kuna kõik katsed olid edukad ja standardhälve oli püsivalt väike, jõuti järeldusele, et meetod oli täpsem, kuid arvestada tuleb komponentide neeldumisspektrite kattumist. Kromatograafilise meetodi puhul katsuti leida optimaalseid tingimusi katsetades mitmete eluendi variantidega, mis esialgu andis ilusad kromatogramm standardlahustega, kuid reaalseste joogiproovidega saadi ebamäärased piigid. Kuna ühendite piigid kromatogrammidel hästi ei lahutunud, siis paljusid kromatogramme ei olnud võimalik analüüsida ja aineid määrata.

## **Tänuavaldused**

Kindlasti soovin tänada oma kannatlikku juhendajat, Viia Lepast, väärtusliku abi ja toetava juhendamise eest. Käesoleva lõputöö kirjutamise ajal oli alati minu jaoks saadaval, andes asjalikke nõuandeid ja vajalikke täpsustusi.

## Kasutatud kirjandus

1. Saltmarsh Mike. Essential Guide to Food Additives. RSC Publishing; 2019; 3–27 lk.
2. Silva MM, Lidon FC. Food preservatives - An overview on applications and side effects. Emir J Food Agric; 2016.
3. Msagati TAM. Chemistry of Food Additives and Preservatives; 2012.
4. Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1333/2008, 16. detsember 2008 , toidu lisaainete kohta. Kättesaadav: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX:02008R1333-20230322>
5. Food additives and E numbers - BTSA. Kättesaadav: <https://www.btsa.com/en/food-additives-classification-e-numbers/>
6. Tucker GS. Food preservation and biodeterioration; 2015; lk 213–20.
7. The Difference Between Natural and Synthetic Preservatives. Healthy Starts at Home. Kättesaadav: <https://www.healthystartsathome.org/difference-between-natural-and-synthetic-preservatives>
8. Sen M. Food chemistry : the role of additives, preservatives and adulteration. John Wiley & Sons, Incorporated; 2022; 15–49 lk.
9. Grumezescu AM, Holban AM. Preservatives and preservation approaches in beverages: Volume 15: The science of beverages. Elsevier Science & Technology; 2019; 2–15 lk.
10. Moon KM, Kwon E bin, Lee B, Kim CY. Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products; 2020.
11. Rao LJM, Ramalakshmi K. Recent Trends in Soft Beverages. Woodhead Publishing India PVT. LTD; 2011; 177–207 lk.
12. Ashurst PR. Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices; 2016.
13. Березовская А.В. Характеристика ингредиентного состава безалкогольных напитков. 7-19 lk.
14. Sayed A. The Beverages. Agric Res Technol; 2018 märts 21;14(5).
15. Kutz M. Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering: Second Edition; 2013.
16. Henderson P. Sulfur Dioxide : Science behind this anti-microbial , anti-oxidant , wine a ... Practical Winery and Vineyard. 2009;(Jan/Feb).
17. Garcia-Fuentes A, Wirtz S, Vos E, Verhagen H. Short Review of Sulphites as Food Additives. Eur J Nutr Food Saf. 2015;5(2).

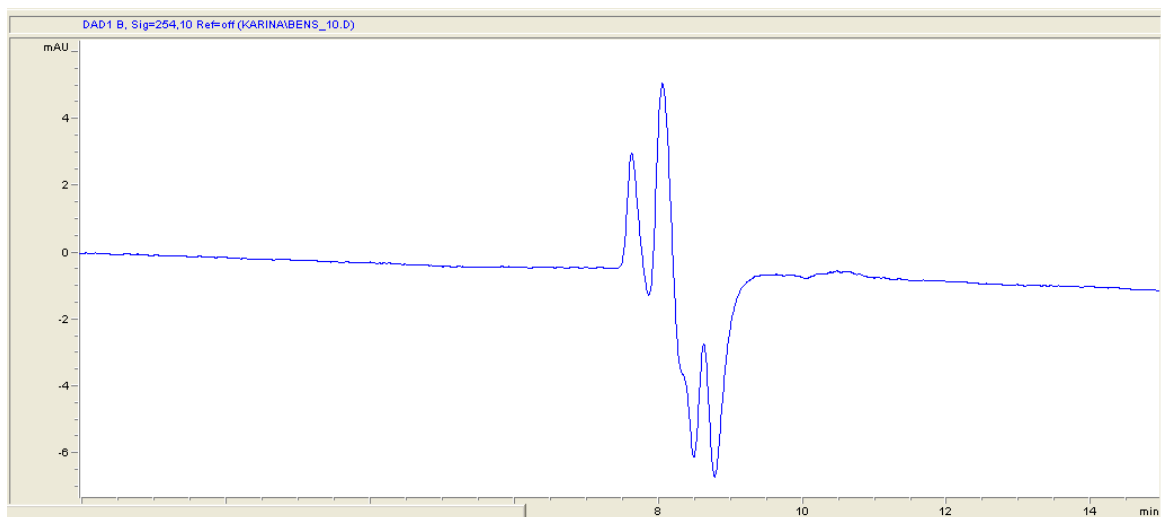
18. Demirci A, Ngadi MO. Microbial decontamination in the food industry: Novel methods and applications; 2012.
19. Aguilar F, Crebelli R, Domenico A di, Dusemund B, Frutos MJ, Galtier P, et al. Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*. 2016 apr 1; 14(4):4438. Kättesaadav: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2016.4438>
20. Rabi S, Abubakar MG, Sahabi DM, Makusidi MA, Dandare A, Bello JH. Benzoic Acid Based Beverages: Health Implications. *Asian Food Science Journal*; 2021.
21. del Olmo A, Calzada J, Nuñez M. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 2017; 57(14).
22. Kregiel D. Health safety of soft drinks: Contents, containers, and microorganisms. *BioMed Research International*; 2015.
23. Anyasi TA, Jideani AIO, Edokpayi JN, Anokwuru CP. Application of organic acids in food preservation. *Organic Acids: Characteristics, Properties and Synthesis*; 2017.
24. Scientific Opinion on the re-evaluation of benzoic acid (E 210), sodium benzoate (E 211), potassium benzoate (E 212) and calcium benzoate (E 213) as food additives. *EFSA Journal*. 2017 jaan 25;14(3).
25. Mercy Magomya A, Garbunga Yebpella G, Chidinma Okpaegbe U, John Oko O, Bature Gambo S. Analysis and Health Risk Assessment of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Selected Fruit Juice and Soft Drink Brands in Nigeria. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*; 2020;6(5).
26. What is Sorbic Acid (E200) in Food & Difference with Potassium Sorbate? Kättesaadav: <https://foodadditives.net/preservatives/sorbic-acid/>
27. Scientific Opinion on the re-evaluation of sorbic acid (E 200), potassium sorbate (E 202) and calcium sorbate (E 203) as food additives. *EFSA Journal*. 2015 juuni 1;13(6).
28. What is Potassium Sorbate (E202) in Food & Why Add it in Wine? Kättesaadav: <https://foodadditives.net/preservatives/potassium-sorbate/#Production>
29. Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel KH, Fowler P, Frutos Fernandez MJ, et al. Opinion on the follow-up of the re-evaluation of sorbic acid (E200) and potassium sorbate (E202) as food additives. *EFSA Journal*. 2019 märts 1;17(3).
30. Komisjoni määrus (EL) 2018/98, 22. jaanuar 2018. Kättesaadav: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX:32018R0098>



31. Martins FCOL, Sentanin MA, de Souza D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. Food Chem. 2019 jaan 30;272:732–50.
32. Aşçi B, Dinç Zor Ş, Aksu Dönmez Ö. Development and Validation of HPLC Method for the Simultaneous Determination of Five Food Additives and Caffeine in Soft Drinks. Int J Anal Chem.; 2016.
33. Gandhimathi M, Pharm M. Analytical Method Development for sodium benzoate and its application to soft drinks and fruit juices. Master of Pharmacy; 2016.
34. Amirpour M, Arman A, Yolmeh A, Akbari Azam M, Moradi-Khatoonabadi Z. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. Food Addit Contam Part B Surveill. 2015 apr 3;8(2):142–8.
35. Petrozzi S. Practical Instrumental Analysis: Methods, Quality Assurance and Laboratory Management; 2013.
36. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis 8th Ed., W. H. Freeman and Company, New York; 2010.
37. Pungar Valentina, Grigorieva Larisa. Instrumentaalanalüüs. Инструментальный анализ учебное пособие для химико-технологических специальностей профессиональных центров; 2012.
38. Chatwal Gurdeep R., Sham K. Anand. Spectroscopy: Atomic and Molecular. Global Media; 2008.
39. Singh Jagdamba. Advanced Practical Chemistry. Global Media; 2009.
40. Васильев В.П. - Аналитическая химия, часть 2. Физико-химические методы анализа: Учеб. для химико-технол. спец. вузов.: Высш. шк.; 1989; 75-76 лн.

## Lisad

**Lisa 1. Na-bensoadi kromatogramm kasutades 70:30% v/v 0,1 M naatriumatsetaat:metanool eluenti, detekteerimise lainepikkus 254 nm**



## Lisa 2. Kalibreerimiskõvera meetodi kontsentratsioonide arvutuste tabel

			Naatriumbensoaat $y=0,0626x+0,022$			Kaaliumsorbaat $y=0,2068x+0,0071$		
	A, 224 nm	A, 254 nm	C, mg/l	C, mg/l 50x lahj	Lõpp. $\bar{C}$ , mg/l	C, mg/l	C, mg/l 50x lahj	Lõpp. $\bar{C}$ , mg/l
Doctor Active	0,437	0,740	6,63	331,5	307,9	3,54	177,2	171,9
	0,402	0,713	6,07	303,5		3,41	170,7	
	0,413	0,723	6,25	312,3		3,46	173,1	
Kanes	0,330	0,577	4,92	246,0	246,3	2,76	137,8	137,9
	0,330	0,577	4,92	246,0		2,76	137,8	
	0,331	0,578	4,94	246,8		2,76	138,0	
Valge Klaar	0,370	0,739	5,56	278,0	278,0	3,54	177,0	176,9
	0,369	0,738	5,54	277,2		3,53	176,7	
	0,371	0,739	5,58	278,8		3,54	177,0	
Mountain Dew	0,246	0,644	3,58	178,9	179,2	3,08	154,0	154,1
	0,246	0,644	3,58	178,9		3,08	154,0	
	0,247	0,645	3,59	179,7		3,08	154,2	
Enjoy	0,397	0,687	5,99	299,5	298,7	3,29	164,4	164,1
	0,395	0,685	5,96	297,9		3,28	163,9	
	0,396	0,686	5,97	298,7		3,28	164,1	

### Lisa 3. Spektrofotomeetrilised arvutused, arvestades kahe komponendi spektrite kattumist

Tabel 1. Sorbiinhappe neeldumiskoeffitsientide leidmine

C, mg/l	A, 224 nm	A, 254 nm	C <sub>M</sub> , mol/l	ε <sub>224</sub>	ε <sub>254</sub>
0,1	0,026	0,036	8,9E-07	29153	40366
	0,026	0,036	8,9E-07	28593	40366
	0,031	0,039	8,9E-07	34760	43730
0,5	0,031	0,103	4,5E-06	6952	23098
	0,030	0,103	4,5E-06	6728	23098
	0,031	0,103	4,5E-06	6952	23098
1	0,063	0,210	8,9E-06	7064	23547
	0,063	0,211	8,9E-06	7064	23659
	0,064	0,211	8,9E-06	7176	23659
2	0,128	0,412	1,8E-05	7176	23098
	0,131	0,420	1,8E-05	7344	23547
	0,132	0,421	1,8E-05	7400	23603
3	0,195	0,628	2,7E-05	7288	23472
	0,196	0,632	2,7E-05	7326	23622
	0,197	0,633	2,7E-05	7363	23659
<b>Kesk. ε väärtused:</b>				7153	23430

Tabel 2. Bensoehappe neeldumiskoeffitsientide leidmine

C, mg/l	A, 224 nm	A, 254 nm	C <sub>M</sub> , mol/l	ε <sub>224</sub>	ε <sub>254</sub>
0,1	0,037	0,018	8,2E-07	45186	21982
	0,034	0,017	8,2E-07	41522	20761
	0,033	0,017	8,2E-07	40423	20761
0,5	0,057	0,020	4,1E-06	13946	4885
	0,053	0,018	4,1E-06	12945	4396
	0,052	0,017	4,1E-06	12701	4225
1	0,080	0,019	8,2E-06	9770	2320
	0,078	0,018	8,2E-06	9526	2210
	0,077	0,017	8,2E-06	9403	2076
2	0,137	0,023	1,6E-05	8365	1404
	0,141	0,024	1,6E-05	8610	1478
	0,140	0,024	1,6E-05	8549	1465
3	0,217	0,035	2,5E-05	8834	1425
	0,218	0,037	2,5E-05	8874	1506
	0,215	0,036	2,5E-05	8752	1465
<b>Kesk. ε väärtused:</b>				8965	1706

Tabel 3. Bensoehappe kontsentratsiooni arvutamine jookides

	A, 224 nm	A, 254 nm	C <sub>M</sub> , mol/l	C, mg/l	C, mg/l 50x lahj	Lõpp. $\bar{C}$ , mg/l
<b>Doctor Active</b>	0,437	0,740	2,5E-05	3,05	152,6	136,3
	0,402	0,713	2,2E-05	2,67	133,3	
	0,413	0,723	2,3E-05	2,78	139,0	
<b>Kanes</b>	0,330	0,577	1,8E-05	2,23	111,3	111,4
	0,330	0,577	1,8E-05	2,23	111,3	
	0,331	0,578	1,8E-05	2,24	111,8	
<b>Valge Klaar</b>	0,370	0,739	1,7E-05	2,09	104,4	104,5
	0,369	0,738	1,7E-05	2,08	103,9	
	0,371	0,739	1,7E-05	2,10	105,1	
<b>Mountain Dew</b>	0,246	0,644	5,8E-06	0,71	35,7	35,9
	0,246	0,644	5,8E-06	0,71	35,7	
	0,247	0,645	5,9E-06	0,72	36,2	
<b>Enjoy</b>	0,397	0,687	2,2E-05	2,71	135,4	134,9
	0,395	0,685	2,2E-05	2,69	134,4	
	0,396	0,686	2,2E-05	2,70	134,9	

Tabel 4. Sorbiinhappe kontsentratsiooni arvutamine jookides

	A, 224 nm	A, 254 nm	C <sub>M</sub> , mol/l	C, mg/l	C, mg/l 50x lahj	Lõpp. $\bar{C}$ , mg/l
<b>Doctor Active</b>	0,437	0,740	3,0E-05	3,34	166,9	182,4
	0,402	0,713	3,2E-05	3,62	181,1	
	0,413	0,723	3,3E-05	3,67	183,7	
<b>Kanes</b>	0,330	0,577	2,6E-05	2,93	146,6	146,7
	0,330	0,577	2,6E-05	2,93	146,6	
	0,331	0,578	2,6E-05	2,94	146,8	
<b>Valge Klaar</b>	0,370	0,739	3,3E-05	3,75	187,7	187,6
	0,369	0,738	3,3E-05	3,75	187,5	
	0,371	0,739	3,3E-05	3,75	187,7	
<b>Mountain Dew</b>	0,246	0,644	2,9E-05	3,27	163,6	163,7
	0,246	0,644	2,9E-05	3,27	163,6	
	0,247	0,645	2,9E-05	3,28	163,9	
<b>Enjoy</b>	0,397	0,687	3,1E-05	3,49	174,5	174,3
	0,395	0,685	3,1E-05	3,48	174,0	
	0,396	0,686	3,1E-05	3,49	174,3	

Lisa 4. Kromatograafilise meetodi kontsentratsioonide arvutuste tabel

	Naatriumbensoaat					Kaaliumsorbaat				
	h, mAU 224 nm	Rt	C, mg/l	2*C, mg/l	C <sub>hape</sub> , mg/l	h, mAU 254 nm	Rt	C, mg/l	2*C, mg/l	C <sub>hape</sub> , mg/l
<b>Doctor Active</b>	410	7,54	59,81	119,62	101,4	1514	9,42	80,87	161,75	120,7
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Kanes</b>	365	7,48	53,92	107,84	91,4	923	9,39	51,97	103,94	77,6
	373	7,84	54,97	109,93	93,2	1024	10,01	56,91	113,82	84,9
	653	7,86	91,64	183,27	155,3	835	9,98	47,66	95,33	71,1
<b>Valge Klaar</b>	328	8,5	49,07	98,15	83,2	1387	9,58	74,66	149,33	111,4
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1391	9,8	74,86	149,72	111,7
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1788	9,86	94,28	188,55	140,7
<b>Mount ain Dew</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	805	10,05	46,20	92,39	69,0
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1049	9,48	58,13	116,26	86,8
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	941	10,31	52,85	105,70	78,9
<b>Enjoy</b>	315	8,72	47,37	94,74	80,3	1228	9,79	66,89	133,77	99,8
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1454	9,96	77,94	155,88	116,3
	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1469	9,88	78,67	157,35	117,4

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina, Karina Nikolajeva

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Säilitusainete määramine karastusjookides kasutades HPLC ja spektrofotomeetria meetodit“, mille juhendaja on Viia Lepane,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

29.05.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.