

**EKSTRAKTSIOONI METOODIKA VÄLJATÖÖTAMINE  
SOJASAPONIINIDE MÄÄRAMISEKS SOJA BAASIL JOGURTI  
ALTERNATIIVIDES**

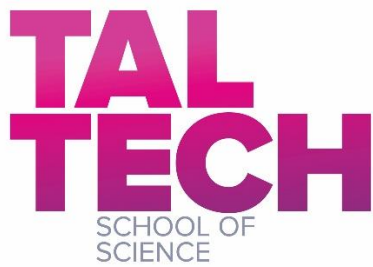
Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Kristina Joarand

Juhendaja: Anastassia Bljakhina, TalTech ja TFTAK AS, tööstusdoktorant

Õppekava: Toidu- ja biotehnoloogia

Tallinn 2023



**DEVELOPMENT OF A SAMPLE EXTRACTION METHOD FOR THE  
DETERMINATION OF SOYASAPONINS IN SOY-BASED YOGURT  
ALTERNATIVES**

Bachelor thesis

Student: Kristina Joarand

Supervisor: Anastassia Bljakhina, TalTech and TFTA AS, Industrial PhD Student

Study program: Food and Biotechnology

Tallinn 2023

## **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: Kristina Joarand

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Anastassia Bljahhina

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

[allkiri ja kuupäev]

# Sisukord

Lühendite loetelu .....	7
Sissejuhatus.....	9
1. Kirjanduse ülevaade .....	10
1.1. Soja baasil jogurti alternatiivid.....	10
1.2. Saponiinid.....	11
1.2.1. Sojasaponiinide tüübid ja keemilised omadused .....	12
1.2.2. Sojasaponiinide tervise mõju ja maitse.....	14
1.2.3. Sojasaponiinide uurimismeetodid.....	14
1.3. Valideerimine .....	15
1.3.1. Valideerimise parameetrid.....	16
1.3.2. Valideerimise meetodid ja juhendmaterjalid.....	18
2. Töö eesmärk.....	20
3. Eksperimentaalne osa .....	21
3.1. Materjalid .....	21
3.1.1. Reagentid.....	24
3.1.2. Standardid .....	24
3.2. Meetodid.....	24
3.2.1. Meetodika väljatöötamine - proovi ekstraktsioon ja saponiinide määramine.....	24
3.2.2. Meetodika valideerimise katsete kirjeldus .....	26
3.2.3. Andmeanalüüs.....	28
4. Tulemused ja arutelu.....	29
4.1. Ekstraktsiooni meetodika välja töötamine .....	29
4.2. Meetodika valideerimise tulemused.....	32
4.3. Sojasaponiinide sisaldus uuritavates soja baasil jogurti alternatiivides .....	34
5. Järeldused .....	36
Kokkuvõte.....	37
Abstract .....	38
Tänuavaldused .....	39
Kasutatud kirjandus.....	40
Lisad.....	43

Lisa 1. Välisstandardite ja YA1 proovi (SIR; ESI-) LC-MS kromatogrammid: (A) sojasaponiin Bb, (B) sojasaponiin Ba, (C) sojasaponiin Aa, (D) sojasaponiin Ab ja (E) sisestandard asperosaponiin VI LC-MS kromatogrammid .....	43
--	----

## Annotatsioon

Tänapäeva üha kasvavas ühiskonnas on tähtsaks missiooniks loomsetele valgu allikatele taimsete alternatiivide leidmine, sinna alla kuuluvad ka taimsed piimaalternatiivid. Enim kasutatavaks alternatiivseks valguks peetakse kõrge kvaliteediga sojavalgu, millest valmistatakse erinevaid soja baasil tooteid, nagu näiteks soja baasil jogurti alternatiive. Soja baasil tooted sisaldavad aga saponiine, mis võivad muuta toidu maitse mõrudaks. Saponiinid on amfiifilsed ühendid, mis omavad just tänu oma amfiifilisele vaieldavale tervisemõju - neil leidub nii häid kui ka halbu bioaktiivseid omadusi. Samuti ei ole teada, kuidas fütomikronutriendid migreeruvad taimevalguallikatest lõpptootesse ning millised muutused molekulides toimuvad. Selle tõttu on saponiinide sisalduse määramine toidus huviallikaks nii toidutootjatele, tootearendajatele, toitumisspetsialistidele kui ka teadlastele.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on töötada välja proovi ekstraktsiooni meetodika sojasaponiinide määramiseks soja baasil jogurti alternatiivides ning see valideerida. Laiemaks eesmärgiks on kindlustada laboris edasiste rutiinanalüüside teostamiseks uus meetodika ning määrata sojasaponiinide sisaldus uuritavates soja baasil jogurti alternatiivides.

Töö käigus viidi läbi sojasaponiinide ekstraktsioonimeetodika arenduskatsed ja sobiva meetodika leidmisel see valideeriti. Valideerimiseks määrati sellised parameetrid nagu kalibratsioonikõver ja kalibratsiooniulatus, tuvastamispiir (LOD), kvantifitseerimispiir (LOQ), selektiivsus, spetsiifilisus/täpsus, kordustäpsus, saagis ja maatriksefekt. Katsete teostamisel kasutati 5 erinevat soja baasil jogurti alternatiivi ning ühte soja baasil jooki. Kõik katsed teostati ettevõttes TFTAK AS ehk Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskus AS.

Töö olulisema tulemusena leiti, et soja baasil jogurti alternatiivide natiivne pH avaldab mõju sojasaponiinide saagisele. Aluseline pH ( $7,0-8,5 \pm 0,2$ ) avaldab saagisele positiivset mõju, kuid happeline pH ( $4,2 \pm 0,2$ ) mitteaktsepteeritavat mõju. Katsed näitasid ka, et soja baasil jogurti alternatiivides ei esine sojasaponiini Aa, mille sisaldused uuritavates proovides jäid alla LOQ taseme. Kõige rohkem sisaldasid proovid sojasaponiini Bb, mille sisaldused jäid vahemikku  $11,7 \pm 0,4$  mg/100g kuni  $14,5 \pm 0,4$  mg/100g. Töö tulemusena töötati välja meetodika sojasaponiinide sisalduse määramiseks sojapõhistes jogurti alternatiivides. Samuti teostati väljatöötatud meetodika valideerimine, mille käigus saadi piisavad ning aktsepteeritavad valideerimistulemused. Töö käigus valideeritud meetodika sobis efektiivselt kommertsiaalselt saadaolevate soja baasil jogurti alternatiivide analüüsiks.

Antud lõputöö jaguneb teoreetiliseks ja eksperimentaalseks osaks. Teoreetilise poole kirjanduslikus osas kirjeldatakse soja baasil jogurti alternatiive, sojasaponiine ning valideerimisprotsessi. Teises osas tuuakse välja töö eesmärk. Kolmandas osas selgitatakse lahti töös kasutatud materjalid ja meetodid. Neljandas osas esitatakse katsete tulemused ning arutletakse nende põhjuste üle. Viimases osas tuuakse punkthaaval esile töö tähtsamad järeldused. Töö koosneb 45 leheküljest, kolmest joonisest ja seitsmest tabelist.

## Lühendite loetelu

ANOVA – dispersioonanalüüs (inglise keeles *Analysis of Variance*)

AOAC – Ametlik Analüütiliste Keemikute Ühing (inglise keeles *Association of Official Analytical Chemists*)

BEH – etüleeniga kaetud hübriid (inglise keeles *Bridged Ethylene Hybrid*)

CC – kolonnkromatograafia (inglise keeles *column chromatography*)

EMA – Euroopa Ravimiamet (inglise keeles *European Medicines Agency*)

ESI – elektropihustusionisatsioon (inglise keeles *electrospray ionization*)

EtOH – etanool

FA – sipelghape ehk metaanhape

FDA – USA Toidu- ja Ravimiamet (inglise keeles *United States Food and Drug Administration*)

GC-MS – gaasikromatograafia-massispektromeetria (inglise keeles *gas chromatography mass spectrometry*)

HILIC-MS – hüdrofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafia massispektromeetria (inglise keeles *hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry*)

HPLC – kõrgsurve-vedelikkromatograafia (inglise keeles *high-performance liquid chromatography*)

ICH – Rahvusvaheline Ühtlustamise Konverents (inglise keeles *International Conference on Harmonization*)

IEC – Rahvusvaheline Elektrotehnika Komisjon (inglise keeles *International Electrotechnical Commission*)

IPA – 2-propanool ehk isopropüülalkohol

IS – sisestandard (inglise keeles *internal standard*)

ISO – Rahvusvaheline Standardimisorganisatsioon (inglise keeles *International Organization for Standardization*)

IUPAC – Rahvusvaheline Puhta ja Rakenduskeemia Liit (inglise keeles *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

KA – kuivaine

LC-MS – vedelikkromatograafia-massispektromeetria (inglise keeles *liquid chromatography-mass spectrometry*)

LLE – vedelik-vedelik ekstraktsioon (inglise keeles *liquid-liquid extraction*)

LOD – avastamise/detekteerimise piir (inglise keeles *limit of detection*)

LOQ – kvantifitseerimise piir (inglise keeles *limit of quantification*)

MALDI – maatriksi abil laser desorptsioon/ionisatsioon (inglise keeles *matrix assisted laser desorption/ionization*)

ME – maatriksefekt (inglise keeles *matrix effect*)

MeCN – atsetonitriil

MeOH – metanool

MQ – MILLI-Q® (Millipore Milli-Q labori vee puhastussüsteem)

MS – massispektromeetria (inglise keeles *mass spectrometry*)

R – saagis (inglise keeles *recovery*)

RSD – suhteline standardhälve (inglise keeles *relative standard deviation*)

RT – retentsiooniaeg (inglise keeles *retention time*)

SANCO – Tervise- ja tarbijaküsimuste peadirektoraat (inglise keeles *Directorate-General for Health and Consumers*)

SBD – soja baasil jook (inglise keeles *soybean-based drink*)

SD – standardhälve (inglise keeles *standard deviation*)

SFE – superkriitiline vedelikekstraktsioon (inglise keeles *supercritical fluid extraction*)

SPE – tahke faasi ekstraktsioon (inglise keeles *solid phase extraction*)

UPLC® – ultra-kõrgsurvevedelikkromatograafia (inglise keeles *ultra high-performance liquid chromatography*)

YA – jogurti alternatiiv (inglise keeles *yoghurt alternative*)



## Sissejuhatus

Tänapäeva jätkusuutlikkuse poole püüdlevas maailmas on taimsete alternatiivsete valguallikate arendamine ja kasutamine üheks tähtsaimaks valdkonnaks toidutehnoloogias. Olulisemaks ja tänapäeval enim kasutatavaks taimepõhiseks valguallikaks peetakse sojaube. Soja baasil toidud on sobivaks alternatiiviks loomsele valgule eelkõige tänu oma kõrgele valgusisaldusele ning kõrgele valgu kvaliteedile – sojaoad sisaldavad kõiki inimorganismile vajalikke aminohappeid. Soja baasil tooted aitavad kaasa ka keskkonna ökoloogilise jalajälje vähendamisele (Qin et al., 2022).

Sojaoad, millest sojatooted on tehtud, sisaldavad aga saponiine, mis võivad muuta toidu maitse kibedaks, samas on saponiinid olulised ka oma bioaktiivsete omaduste poolest (Yates et al., 2021). Samuti ei ole teada, kuidas need fütomikronutriendid migreeruvad toorainest edasi lõpptootesse. Seetõttu on saponiinide sisaldus toidus tänapäeva toidutootjatele, aga ka teadlastele ja toitumisspetsialistidele oluline informatsioon.

Käesolevas töös keskendutakse sojasaponiinide (sojasaponiin Aa, sojasaponiin Ab, sojasaponiin Ba ja sojasaponiin Bb) määramise meetodika arendamisele soja baasil jogurti alternatiivides. Uurimistöö põhieesmärgiks on selle meetodika väljatöötamine ja valideerimine ning seeläbi rutiinanalüüside teostamiseks uue meetodika kindlustamine. Sojasaponiinide sisalduse määramiseks kasutati HILIC-MS meetodit koos sisestandardiga lahjendamisega. Kõik katsed viidi läbi Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskuses (TFTAK AS). Läbiviidud töö tulemuste põhjal on publitseeritud ka artikkel (Bljahhina, Kuhtinskaja, et al., 2023).

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade sojasaponiinidest ja nende omadustest, erinevatest sojasaponiinide tüüpidest ning uurimismeetoditest. Samuti tutvustatakse valideerimise mõistet, erinevaid valideerimisparameetreid ning meetodeid. Eksperimentaalses osas esitatakse analüüsitava sojast jogurti alternatiivide ettevalmistuse, meetodi välja töötamise ja meetodi valideerimise katsete ning andmeanalüüsi kirjeldus. Lõpuks esitatakse ka töö käigus saadud tulemused ja järeldused.

# 1. Kirjanduse ülevaade

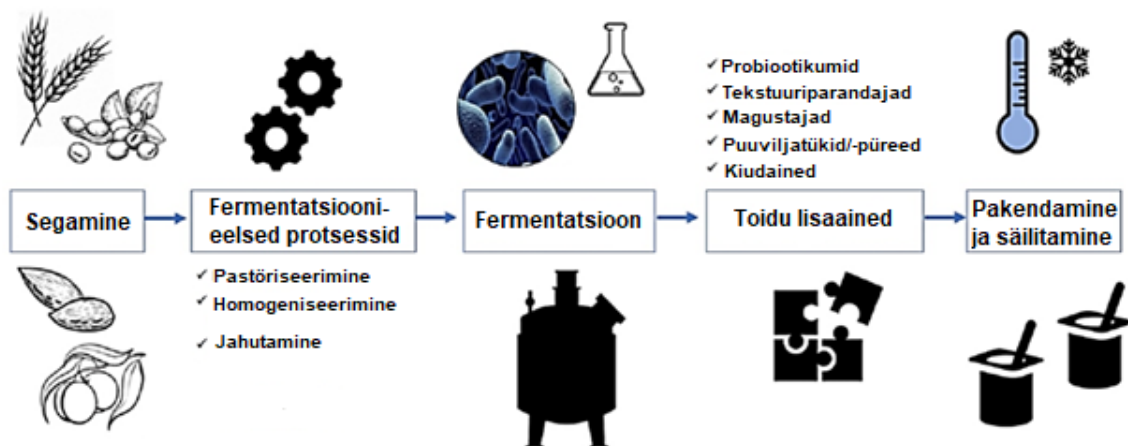
## 1.1. Soja baasil jogurti alternatiivid

Suurenev rahvaarv ning seeläbi kasvav valgu tootmise ja tarbimise vajadus on toonud huvi taimsete valguallikate kasutamise juurde. 2050. aastaks kasvab rahvastiku arv eeldatavalt 9,7 miljardini ning selleks vajaliku valgu koguse tootmine puhtalt loomsetest allikatest oleks kahjulik nii keskkonna kui ka inimeste tervise vaatepunktist. (Dhakal et al., 2023) Samuti on tõusnud tarbijate nõudlus taimsete piimaalternatiivide osas, mille üheks põhjuseks on inimeste toitumispiirangute esinemise sagenemine (Huang et al., 2022). Huvi taimepõhiste jogurti alternatiivide vastu on ülemaailma tõusu teel – 2019. aastal oli taimepõhiste jogurti alternatiivide turu väärtuseks 1,6 miljardit USA dollarit ning 2026. aastaks ennustatakse selleks 2,89 miljardit USA dollarit (Dhakal et al., 2023).

Taimepõhised jogurti alternatiivid on enamasti valmistatud kaunviljade, teraviljade ja õliseemnete ekstraktidest ning võrreldes piimapõhise jogurtiga on neil seetõttu varieeruvad omadused. Taimsete jogurti alternatiivide toormaterjalina kasutatakse näiteks sojaube, mandleid, kookospähklit, riisi või kaera. Tekstuuri ja sensorsete omaduste poolest sarnanevad need piimapõhistele jogurtitele. (Dhakal et al., 2023)

Traditsioonilist piimast tehtud jogurtit valmistatakse fermenteerimise meetodil, kasutades starterkultuuridena enamasti *Streptococcus thermophilus*'t või *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*'t. Sarnast meetodit kasutatakse ka taimepõhiste jogurti alternatiivide valmistamiseks. (Montemurro et al., 2021)

Soja baasil jogurti alternatiivi võib nimetada fermenteeritud sojajoogiks (Johnson et al., 2015). Selle põhikoostisosadeks on sojaubadest saadav sojajoog, suhkur ning jogurti starterkultuurid (*Streptococcus thermophilus* ja *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*). Soja baasil jogurti alternatiivi valmistamise põhiprotsessid on toodud Joonis 1. (Akusu OM & Wordu GO, 2017.)



Joonis 1. Soja baasil jogurti alternatiivi valmistamise põhietapid. Kohandatud (Akusu OM & Wordu GO, 2017) põhjal

## 1.2. Saponiinid

Saponiinid on amfiifilised glükosiidid, mida leidub taimedes. Nad koosnevad hüdrofiilsest glükosiidi jäägist ja hüdrofoobsest aglükoonist - triterpeeni või steroidi derivaadist. (*Amphipathic - Definition and Examples - Biology Online Dictionary, 2019*) Vastavalt hüdrofoobse osa struktuurile jagatakse saponiinid terpeensete või steroidsete saponiinide rühmadesse (Roopashree & Naik, 2019).

Saponiinid on peamiselt tuntud oma vahtumoodustavate ja pindaktiivsete omaduste poolest. Selle omaduse tõttu on saponiinid ka oma nimetuse saanud - sõna "saponiin" tuleb ladina keelsest sõnast "seep" ehk "sapo". Nende võime moodustada vahtu on põhjustatud saponiini mittepolaarse sapogeniini osa (triterpeeni või steroidi) ja polaarsete kõrvalahela koosluse tulemusena. (Roopashree & Naik, 2019) Vesilahustes võivad saponiinid tekitada vahtu ning vähendades lahuse pinna pinget moodustada ka mitselle (Rai et al., 2021).

Peamiseks saponiinide allikaks toidus on sojaoad ja soja baasil tooted, aga ka teised kaunviljad nagu kikerhernes, rohelised herned, läätsed, harilik lutsern ning erinevat muud liiki oad (aedoad, pärload jt). Saponiine leidub ka maapähklites, päevalilleseemnetes, ženženni juurtes, hobukastanis, teelehtedes, lagritsajuurtes, kinoa seemnetes, tomatiseemnetes, aga ka baklažaanis, sparglis ja paprikas (Sharma et al., 2023).

### 1.2.1. Sojasaponiinide tüübid ja keemilised omadused

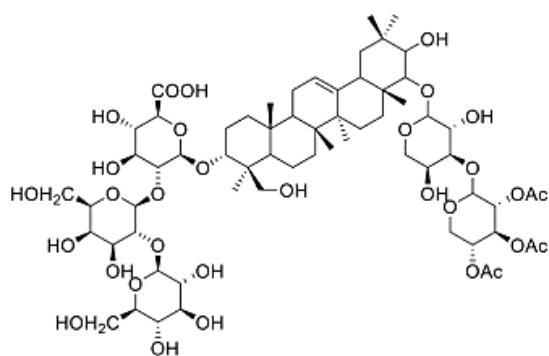
Sojasaponiinid kuuluvad terpeensete saponiinide gruppi ning nende hüdrofoobne osa koosneb triterpenoidsest glükosiidist (Decroos et al., 2005).

Sojasaponiinid on triterpenoidsed saponiinid, mis jagunevad kolme gruppi: rühm A, B ja E saponiinid. A rühma sojasaponiinidel asuvad glükosiidi ahelad selle aglükooni C-3 ja C-22 asendis. B-rühma sojasaponiinid omavad ainult ühte glükosiidi ahelat ning see asub aglükooni C-3 asendis. E-rühma sojasaponiinid on vähem tuntumad ning neid peetakse B-rühma sojasaponiinide fotooksüdatsiooni produktideks. (Decroos et al., 2005)

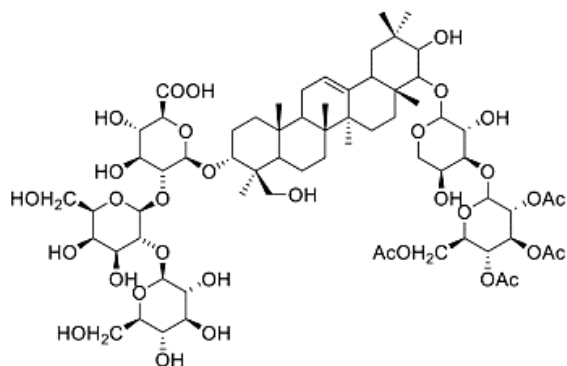
Nii A, B kui ka E rühma sojasaponiinidel on C-3 asendis sarnase struktuuriga suhkruahel: alates glükuronüüli jäägiga, millele järgneb galaktosüüli või arabinosüüli jääk ning lõppedes enamikul juhtudel glükosüüli või ramnosüüli jäägiga. A-rühma sojasaponiinide C-22 asendis paiknev kõrvalahel koosneb kahest suhkrujäägist: algusosa koosneb arabinosüüli jäägist ja terminaalne osa ksülosüüli või glükosüüli jäägist, mis on atsetüleeritav vastavalt kas kolmes või neljas positsioonis. Sojaubades on rühm A sojasaponiinid täielikult atsetüleeritud. (Decroos et al., 2005)

Käesolevas töös analüüsiti järgmiseid sojasaponiine: sojasaponiin Aa, sojasaponiin Ab, sojasaponiin Ba ja sojasaponiin Bb, mille keemilised struktuurid on kujutatud alloleval Joonis 2. Sojasaponiin Aa ( $C_{64}H_{100}O_{31}$ ) (PubChem, 2023b) ja sojasaponiin Ab ( $C_{67}H_{104}O_{33}$ ) (PubChem, 2023d) kuuluvad A rühma sojasaponiinide hulka. Sojasaponiin Ba ( $C_{48}H_{78}O_{19}$ ) (PubChem, 2023a) ja sojasaponiin Bb ( $C_{48}H_{78}O_{18}$ ) on osa B rühma sojasaponiinidest (PubChem, 2023c).

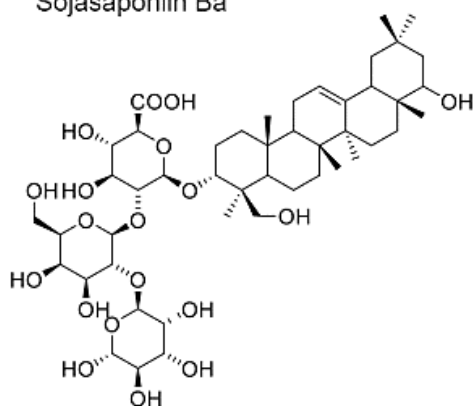
Sojasaponiin Aa



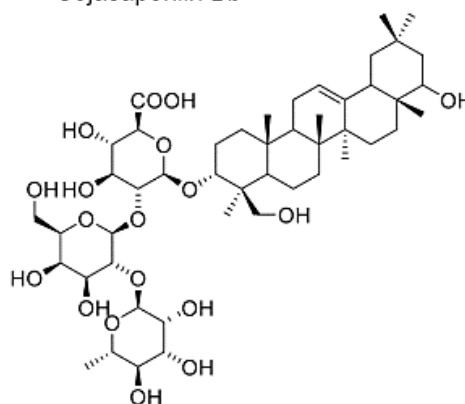
Sojasaponiin Ab



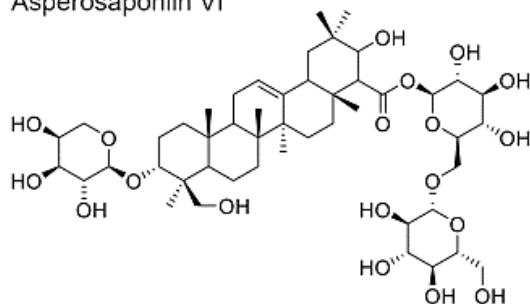
Sojasaponiin Ba



Sojasaponiin Bb



Asperosaponiin VI



Joonis 2. Analüüsitud sojasaponiinide (sojasaponiin Aa, sojasaponiin Ab, sojasaponiin Ba ja sojasaponiin Bb) ja sisestandardina (IS) kasutatud asperosaponiin VI keemilised struktuurid

### 1.2.2. Sojasaponiinide tervisemõju ja maitse

Sojasaponiinidel on mitmeid nii kasulikke kui ka kahjulikke bioloogilisi efekte just nende amfiifilsete omaduste tõttu (Singh et al., 2017). Sojasaponiine peetakse tähtsateks bioaktiivseteks ühenditeks ning mõnede uuringute kohaselt on saponiinidel tervisele kasulik mõju (Singh et al., 2017). Shi et al. (2009) on näiteks oma uuringutes leidnud, et saponiinide tarbimine aitab kaasa vähiriski ennetamisele, alandab veresuhkru ning vere kolestereooli taset. Lisaks on leitud, et saponiinid aitavad põletiku vastu, omavad immuunsüsteemi stimuleerivat ja antioksüdantset toimet (Singh et al., 2017). Samas leidub saponiinide kohta ka väga vastakaid seisukohti. Saponiine peetakse ka näiteks antinutrientideks ning on leitud, et nad omavad hemolüütilist, membranlüütilist ja fungitoksilist toimet (Singh et al., 2017). Samuti võivad saponiinid pärssida teiste toitainete, nagu vitamiinide (nt vitamiin A ja E) ja mineraalainete imendumist, vähendades nende bioloogilist kättesaadavust. Lisaks on leitud, et saponiinid võivad osutada toksiliseks tarbides neid kõrgetes kontsentratsioonides. (Samtiya et al., 2020)

Saponiine peetakse peamiseks mõruda maitse ning kootava või kuiva suutunde tekitajaks taimepõhistes toitudes (Singh et al., 2017). Arvatakse, et saponiinide mõru maitseomadus on neile kaitsemehhanismiks herbivooride vastu (*Cornell University Department of Animal Science*, 2019) ning on tuvastatud, et mõru maitse intensiivsus erineb olenevalt saponiini tüübist (Takada et al., 2013). Sojasaponiinide puhul on leitud, et A rühma sojasaponiinid on tunduvalt mõrudama maitsega kui seda on B rühma omad ning seetõttu peetakse just neid peamiseks mõruda maitse põhjustajaks soja baasil piimaalternatiivides (Sundaramoorthy et al., 2018).

### 1.2.3. Sojasaponiinide uurimismeetodid

Proovi ettevalmistus protsess sõltub proovi olemusest. Kui tegemist on kuiva prooviga (nt läätsed, sojaoad, hernerid), siis seda enamasti leotatakse või keedetakse, seejärel külmuivatatakse ja jahvatatakse. Kui juba on tegemist jahvatatud prooviga, nt soja pulbri või sojaalguisolaadiga, siis saab sellega otse ekstraktsiooni protsessi alustada. (Sagratini et al., 2013) Juhul kui on tegemist vedela prooviga, siis enamasti seda eelnevalt külmuivatatakse ehk lüofiliseeritakse – viiakse see kuivale kujule ning alles seejärel saab alustada ekstraktsiooni protsessi (Chitisankul et al., 2021). Antud töös kasutatakse vedelal kujul proovi otse analüüsimist.

Saponiinide analüüsimiseks on võimalik kasutada erinevaid ekstraktsioonimeetodid. Mõnedeks traditsiooniliseimateks meetoditeks saponiinide eraldamiseks on näiteks matseratsioon ja Soxhlet ekstraktsioon (Aziz et al., 2019), kuid kasutusel on ka kaasaegsemad tehnikad nagu ultraheli ekstraktsioon, mikrolaine abiga ekstraktsioon, kiirendatud lahustiga ekstraheerimine ning ülekritilise fluidumiga ekstraktsioon (SFE) (Ligor et al., 2018). Saponiinide isoleerimise ja proovi puhastamise eesmärgil kasutatakse tihti lisaks tahke faasi ekstraktsiooni (SPE), kasutades kas süsiniku või polümeeri baasil adsorbente; vedelik-vedelik ekstraktsiooni (LLE) või kolonnkromatograafiat (CC) (Ligor et al., 2018).

Tavaliste analüüsimeetoditena saponiinide sisalduse määramiseks on kasutusel kõrgsurve vedelikkromatograafia (HPLC), gaasikromatograafia-massispektromeetria (GC-MS), maatriksi abil laser desorptsioon/ionisatsioon (MALDI) (Ligor et al., 2018), vedelik-kromatograafia massispektromeetria (LC-MS) või UV-kiirguse abil detekteerimine. Viimane ei ole kõige tõhusam meetod, kuna saponiinid ei sisalda UV-ga tuvastatavaid kromofore. (Cheok et al., 2014) Populaarsemaks meetodiks on aga saamas hüdrofiilse interaktsiooni vedelik-kromatograafia massispektromeetria (HILIC-MS), mida kasutatakse ka antud töös (Bljahhina et al., 2023).

### **Hüdrofiilse interaktsiooni vedelik-kromatograafia massispektromeetria (HILIC-MS)**

Hüdrofiilse interaktsiooni vedelik-kromatograafia massispektromeetria (HILIC-MS) on kõrgsurvevedelik-kromatograafia liik. Seda kasutatakse tavaliselt polaarsete ühendite eraldamiseks, kuid sobib hästi ka amfiifilsete ühendite eraldamiseks, mis ei lahutu hästi tavalise pööratud faasi vedelik-kromatograafia puhul. (Buszewski & Noga, 2012) HILIC meetodikas kasutatakse statsionaarse faasina hüdrofiilse materjaliga täidetud lahutuskoloni ning mobiilse faasina kõrge kontsentratsiooniga hüdrofoobset orgaanilist solventi (nt atsetonitriili) koos väikse koguse veega (Boersema et al., 2008).

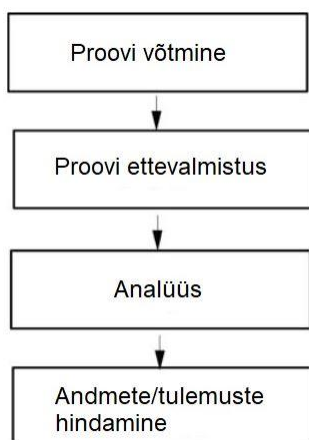
Saponiinide tuvastamiseks kasutatakse HILIC tehnoloogiaga käsikäes elektropihustusionisatsiooni süsteemiga (ESI) massispektromeetria (MS). Peale proovi kromatograafilist lahutamist läbivad proovi molekulid ionisatsiooniallika, kus pihustatud molekulid ioniseeritakse. Ioniseerimiseks kasutatakse ESI ionisatsioonisüsteemi, kus ioniseerimiseks kasutatakse kõrgepingepotentsiaali – elektrivoolu abil viiakse vedeliku osakesed gaasi faasi. Edasiseks analüüsiks saadetakse ioonid massianalüsaatorisse, kus süsteem identifitseerib analüüdi ioone vastavalt nende massi-laengu suhtele. (Chen et al., 2019)

## **1.3. Valideerimine**

Valideerimine on protsess, mida kasutatakse tõestamiseks, et analüütiline meetod on sobilik mingi spetsiifilise analüüsi läbi viimiseks ning täidab oma eesmärgi. Valideerimine teeb kindlaks analüüsiks kasutatava meetodi kvaliteedi. (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020) See väljendab analüütilise meetodi paikapidavust (Kruve et al., 2015a) ning on saanud laboritele üldtunnustatud protseduuriks usaldusväärsete andmete esitamiseks (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020).

Valideerimine on analüütilise meetodi abil saadud tulemuste usaldusväärsuse tagamisel võtmekomponendiks. Mida keerulisem on kasutatav meetod, seda olulisem ning töömahukam on valideerimisprotsess – sel juhul on tähtis näidata, et meetod toimib ning selle tulemustele võib tugineda. Valideerimisel saadav informatsioon on oluline nii labori enda kui ka kliendi jaoks: labor saab enesekindluse oma tulemuste osas ja oskab vajadusel teha oma töös parandusi, kui meetod ei tööta nii nagu peaks ning klient saab kindlustunde talle esitatud tulemuste paikapidavuse kohta. (Kruve et al., 2015a)

Kõikide analüütiliste meetodite puhul on valideerimine kohustuslik (Kruve et al., 2015a) ning valideerida tuleb kogu analüütiline protsess alates proovi võtmisest kuni andmetöötluseni (Huber, 1998). Analüütilise protsessi põhietapid on toodud Joonis 3.



Joonis 3. Analüütilise protseduuri valideeritavad etapid. Kohandatud (Huber, 1998) põhjal

Analüütilisi meetodeid on vajalik valideerida või mõnikord ka taasvalideerida erinevatel juhtudel: enne meetodi rakendamist rutiinanalüüside teostamiseks; varasemal valideerimisel kasutatud tingimuste muutumisel, näiteks teistsuguste omadustega instrumendi kasutuselevõtmisel või varasemast erineva maatriksi kasutamisel – kokkuvõtlikult on valideerimine vajalik igasuguse meetodi muudatuse korral, mis jääb väljapoole algset kohaldamisala (Huber, 1998).

### 1.3.1. Valideerimise parameetrid

Valideerimiseks leidub arvukalt erinevaid juhendmaterjale, mis sisaldavad ka erinevat informatsiooni kindlaks määratavate parameetrite kohta (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). Peamisteks näitajateks, mida analüütilise meetodi valideerimise käigus määratakse on täpsus, õigsus, kordustäpsus, saagis, püsivus, vastupidavus, selektiivsus, tuvastamispiir (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020), aga ka kvantifitseerimispiir, lineaarne ala ja tundlikkus (Kruve et al., 2015a).

**Selektiivsus** (ingl.k. *selectivity*) on oluline faktor kõikide analüütiliste meetodite puhul – see näitab, kas meetod on analüüdi suhtes selektiivne või mitte. Maatriksid koosnevad päriselus enamasti mitmetest erinevatest koostisosadest, seega on tähtis, et analüüsi tulemused iseloomustaksid konkreetse uuritava analüüdi sisaldust, mitte kõrvalkomponentide oma. (Kruve et al., 2015a) Selektiivsus on väärtus, millega näidatakse kui suurel määral segavad maatriksi teised ained analüüdi kindlaksmääramist (Thompson et al., 2002). Segajate poolt tekitatud mõju nimetatakse interferentsiks ning mida rohkem esineb interferentsi, seda madalam on meetodi selektiivsus. Meetodit, mille selektiivsus on 100%, võib nimetada **spetsiifiliseks**. Reaalsed analüütilised protseduurid ei ole kunagi täielikult spetsiifilised, küll aga on võimalik, et need on spetsiifilised oma rakendusala piirides, näiteks võib meetod spetsiifiline



olla kindla analüüdi jaoks kindlas maatriksis ning teatud kontsentratsioonivahemikus. (Kruve et al., 2015a)

**Lineaarne ala** (ingl.k. *linear range*) on parameeter, mis iseloomustab meetodi lineaarsust. Lineaarse ala mõiste all peetakse silmas sellist uuritava aine kontsentratsioonide vahemikku, kus signaalid on otseselt proportsioonis analüüdi kontsentratsiooniga proovis. (Kruve et al., 2015b)

**Tundlikkus** (ingl.k. *sensitivity*) on samuti seotud meetodi lineaarsusega. See on mõõteseadme vastuse/tagasiside muutus, mis vastab muutusele mõõdetud analüüdi koguses. Tundlikkust saab defineerida ka kui kalibratsioonikõvera tõusu kvantifitseerimispiiri (LOQ) lähedal. (U.S. Food and Drug Administration, 2019)

**Kordustäpsus** (ingl.k. *precision*) iseloomustab kindlaksmääratud tingimustel samade proovide korduvate mõõtmiste tulemusel saadud väärtuste kokkulangevust. Seda väljendatakse tavaliselt absoluutse või suhtelise standardhälbe, dispersiooni või variatsioonikordajana. (Raposo & Ibello-Bianco, 2020) Kordustäpsusega tehakse kindlaks kasutatava süsteemi juhuslik viga (Kruve et al., 2015b).

**Õigsus** (ingl.k. *trueness*) näitab, kui palju erineb lõpmatul arvul korduvalt mõõdetud väärtuste keskmine tegelikust väärtusest. Õigsusega määratakse kindlaks süsteemi süstemaatiline viga. (Kruve et al., 2015b)

Käsitäpsusega määratakse ka meetoodika **maatriksefekt** (ME) (ingl.k. *matrix effect*). Maatriksefektiks nimetatakse ionisatsiooni pärssimist või tugevdamist teiste proovis leiduvate ühendite poolt. (Kruve et al., 2015b)

**Täpsus** (ingl.k. *accuracy*) väljendab eelnevate parameetrite – kordustäpsuse ja õigsuse koosmõju ning näitab ühe mõõtetulemuse lähedust tõesele väärtusele – see on ka peamine erinevus õigsusest, kuna õigsus viitab alati korduvalt mõõdetud tulemuste keskmisele väärtusele. (Kruve et al., 2015b)

**Saagis** (ingl.k. *recovery*) iseloomustab analüütilise ekstraktsioonimetoodika efektiivsust ning näitab, kui suur on uuritava analüüdi sisaldus proovis. Saagist määratakse, võrreldes enne ekstraktsiooni maatriksile juurde lisatud ja sealt ekstraheeritud analüüdi kogust tegeliku analüüdi kontsentratsiooniga lahuses. (Kruve et al., 2015b)

**Vastupidavus** (ingl.k. *ruggedness*) ja **püsivus** (ingl.k. *robustness*) on parameetrid, mida tihti defineeritakse käsitäpsuse, kuna need on väga sarnased. Need terminid viitavad analüütilise meetodi võimele jääda sõltumatuks varieeruvatele meetoodilistele (nagu mobiilse faasi koostis, kolonni vanus, kolonni temperatuur) ja keskkondlikele tingimustele (nagu õhu temperatuur, õhuniiskus) (Kruve et al., 2015a).

**Vastupidavuse** mõistet kasutatakse enamasti meetoodika väliste tegurite (näiteks kui varieeruvad analüüsi läbiviija, instrument, reagentid, erinevad päevad) varieeruvusest sõltuvuse kirjeldamiseks (Kruve et al., 2015a).

**Püsivus** väljendab rohkem meetodika stabiilsust sisemiste tegurite, nagu proovi ettevalmistuse, liikuva faasi koostise ja voolukiiruse, kolonni temperatuuri, erineva maatriksi varieeruvuse suhtes (Kruve et al., 2015a).

**Tuvastamispiir** (ingl.k. *limit of detection - LOD*) on väikseim kogus analüüti proovis, mida on võimalik usaldusväärselt eristada nullist. LOD-d kasutatakse peamiselt kahel eesmärgil: esiteks, et hinnata, kas valitud meetodiga analüüt detekteeriti, võrreldes LOD väärtust proovi analüüsi tulemusega; teiseks analüütilise meetodi madalate analüüdi kontsentratsioonide detekteerimise võime iseloomustamiseks ning teiste laborite või standarditega võrdlemiseks. (Kruve et al., 2015a)

**Kvantifitseerimispiir** (ingl.k. *limit of quantitation - LOQ*) on madalaim analüüdi kontsentratsioon proovis, mida on veel võimalik kvantifitseerida aktsepteeritava korratavuse ja õigsuse piirides. LOQ määratakse kindlaks õigsuse ja kordustäpsuse parameetrite abil. Sarnaselt LOD-ga kasutatakse ka LOQ-d kahel põhjusel: selleks, et tuvastada, kas mõõdetud proovi kontsentratsioon on vahemikus, mis võimaldab seda kasutatava meetodiga piisava täpsusega kvantifitseerida ning selleks, et iseloomustada analüüsimeetodit. Nii LOD kui ka LOQ on seotud meetodika tundlikkusega – mida kõrgem on tundlikkus, seda madalamad on LOD ja LOQ. (Kruve et al., 2015a)

### 1.3.2. Valideerimise meetodid ja juhendmaterjalid

Sageli ei ole kõikide valideerimisparameetrite määramine ehk täielik valideerimine vajalik ning kasutatakse osalist valideerimist. Osalist valideerimist rakendatakse kui kasutatakse mõnda standardmeetodit (nt ISO), viiakse sisse väikseid muudatusi varem valideeritud meetodites või valideerides kitsa kasutusala meetodeid. Väikesteks muudatusteks loetakse enamasti uue maatriksi lisamist meetodikasse, proovi ettevalmistusel uue reagenti kasutuselevõttu või näiteks meetodi üleviimist teise laborisse. Iga meetodi valideerimisel määratakse kindlaks erinevaid parameetreid vastavalt meetodi spetsiifikale ning vajadustele. (Kruve et al., 2015a)

Valideerimise juures eristatakse peamiselt kahte erinevat valideerimistüüpi: ühe labori põhiskohal ehk ingl.k. *single-laboratory* valideerimist ja kindlaksmääratud nõuete järgi valideerimist - akrediteerimist ehk ingl.k. *accreditation* (Taverniers et al., 2004). Labori põhine valideerimine tähendab labori enda sisemist valideerimist. Seda rakendatakse kui laboris tahetakse kasutusele võtta uut analüüsimeetodikat, kuid seejuures ei ole laborile oluline, et meetodika oleks mõnele rangele standardile vastav – tähtis on, et valideerimisega saadakse kindlustunne oma meetodika sobivuse osas. Akrediteerimine viiakse läbi kui eesmärgiks on labori kvalifitseerimine mingitele kindlatele kriteeriumitele vastavaks – siia kuulub näiteks rahvusvaheliste standardite ISO/IEC sertifikaatide taotlemine. (Thompson et al., 2002)

Analüütiliste meetodite labori põhiseks valideerimiseks ei eksisteeri ühte kindlat reeglistikku. Erinevaid valideerimisjuhendeid ehk ingl.k. *guideline* on suur hulk ning seega on ka palju erinevaid tehnikaid, kuidas valideerimist läbi viia. Valideerimisel kasutatakse erinevaid teaduslikes andmebaasides leiduvaid

juhendmaterjale vastavalt sellele, milline on valideeritav meetoodika. Enamasti modifitseerib valideerija juhendmaterjali veel lähtuvalt oma meetoodikast (Thompson et al., 2002).

Valideerimisjuhendid varieeruvad sõltuvalt mitmetest erinevatest asjaoludest nagu proovide maatriksitest, analüüsitavatest ühenditest, analüüsiks kasutatavast tehnikast, kasutusvaldkonnast ja analüüsi tasandist (labori põhine, riiklik või rahvusvaheline). Lähtuvalt eelnevatest faktoritest erinevad juhendmaterjalid üksteisest kasutusala ja terminoloogia, protseduuri eesmärgi (näiteks kas tegemist on tootearenduse, kvaliteedikontrolli või teadustööga), analüütiliste tehnoloogiate, parameetrite, eksperimentaalsete protseduuride ja nende järjekorra ning vastuvõetavuse kriteeriumite poolest. (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020)

Mõned populaarsemad analüütiliste meetodite puhul kasutatavad valideerimisjuhendid on järgmised: IUPAC, ICH, AOAC, Eurachem, EMA, FDA ja SANCO poolt välja antud juhendmaterjalid (Kruve et al., 2015a).

## 2. Töö eesmärk

### Uurimistöö probleem

Üheks olulisemaks väljakutseks toidutehnoloogia valdkonnas on leida loomsetele valkudele taimsed alternatiivid, mis säilitaksid samal ajal oma toitainelised väärtused. Peamiseks asendajaks loomsetele valkudele on saanud sojavalk ning soja baasil toidud oma potentsiaalselt kasulike mõjude ning kõrge valgusisalduse ja valgu kvaliteedi tõttu. (Qin et al., 2022)

Soja baasil tooted sisaldavad aga saponiine, millel on küll leitud bioaktiivseid omadusi, kuid põhjustavad mõrudat maitset (Yates et al., 2021) – see võib osutada tarbija jaoks ebaatraktiivseks. Seega on sojasaponiinide sisaldus katsumuseks sojatoote arendajatele ning saponiinide sisalduse määramine võiks pakkuda huvi ka toidutootjatele, toitumisspetsialistidele ja teadlastele. Samuti on võimalus sama meetodit kasutada teiste taimsete piimaalternatiivide sojasaponiinide sisalduse uurimiseks. Töö uudsus seisneb selles, et varasemalt ei ole sojasaponiinide määramisel kasutatud vedelate proovi maatriksite otse analüüsimist, vaid tavaliselt vedel proov enne lüofiliseeritakse. Selline vedelate proovide otse analüüsimine eelneva külmuivatamiseta, võimaldab hoida kokku nii aega kui ka laboriressursse ning vähendab erinevate laboriseadmete kasutamise vajadust.

Käesolev uurimistöö on osaks juhendaja doktoritööst, mis keskendub mõrude ühendite uurimisele taimsetes valgu allikates. Uurimistöös saadud tulemuste põhjal publitseeriti ka artikkel pealkirjaga „Development of Extraction Method for Determination of Saponins in Soybean-Based Yoghurt Alternatives: Effect of Sample pH“ (Bljakhina, Kuhtinskaja, et al., 2023).

**Bakalaureusetöö eesmärgiks** on välja töötada proovi ekstrahtsiooni meetodika saponiinide määramiseks soja baasil jogurti alternatiivides ning seejärel meetodika valideerida, et kindlustada uus meetod edasiste rutiinanalüüside läbiviimiseks.

## **3. Eksperimentaalne osa**

### **3.1. Materjalid**

Töös kasutati kuute erinevat soja baasil proovi: viite soja baasil jogurti alternatiivi (YA) ning ühte soja baasil jooki (SBD) (vt tabel 1), mis pärinesid kohalikest Prisma kauplustest. Kõikidest kasutatud proovidest võeti alikvoodid ja säilitati -20°C juures. Tabelis 1 on näha ka proovide koostisosad ja nende toitumisalane info 100g toote kohta.

Tabel 1. Proovide info

Proovi kood	Proovi nimetus	Tootja	Koostisosad	Toitumisalane teave 100g kohta
YA1	Alpro Plain	Alpro	Sojapõhi (vesi, lüditud sojaoad (10,7%)), suhkur, kaltsium (trikaltsiumtsitraat), stabilisaator (pektiinid), happesuse regulaatorid (naatriumtsitraadid, sidrunhape), lõhna- ja maitseained, meresool, antioksüdandid (tokoferoolirikas ekstrakt, askorbiinhappe rasvhappeestrid), vitamiinid (B12, D2), jogurtikultuurid ( <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> )	Energia: 212 kJ / 51 kcal; Rasvad: 2,3 g; millest küllastunud rasvhappeid: 0,4 g; monoküllastumata rasvhapped: 0,5 g; polüküllastumata rasvhapped: 1,4 g; Süsivesikud: 2,1 g; millest suhkruid: 2,1 g; Kiudained: 1 g; Valk: 4 g; Sool: 0,25 g; D-vitamiin: 0,75 µg; vitamiin B12: 0,38 µg; Kaltsium: 120 mg
YA2	Rainbow Sojavalmistete	Rainbow	Vesi, mahesojaoad (11,5%), mahemaisitärklis, sool, jogurtikultuurid	Energiat 209 kJ / 50 kcal; Rasvad: 2,6 g; millest küllastunud rasvu: 0,4 g; Süsivesikud: 1,5 g; millest suhkrud: 0,4 g; Valk: 4,7 g; Sool: 0,07 g
YA3	Valsoia - Peach and Maracuja	Valsoia	Sojajook 76,5% (vesi, sojaoad 8,7%), suhkur, virsik (7,9%), vesi, maracuja (0,9%), modifitseeritud tärklis, dekstroos, kaltsiumfosfaat, paksendaja: pektiin, tsitruselised kiudained, lõhna- ja maitseained, happesuse regulaator: viinhape, vitamiinid: riboflaviin (B2), B12, D2, eluskultuurid	Energia: 320 kJ, 76 kcal; Rasvad: 1,5 g; millest küllastunud rasvhappeid: 0,2 g; monoküllastumata rasvhapped: 0,2 g; polüküllastumata rasvhapped: 1,1 g; Süsivesikud: 12 g; millest suhkrud: 11 g; Kiudained: 0,7 g; Valk: 3,2 g; Sool: 0,01 g; B2-vitamiin: 0,21 mg; vitamiin B12: 0,38 µg; D2-vitamiin: 1,5 µg; Kaltsium: 120 mg

Tabel 1 järg. Proovide info

Proovi kood	Proovi nimetus	Tootja	Koostisosad	Toitumisalane teave 100g kohta
YA4	Alpro Peach	Alpro	Sojapõhi (vesi, lüditud sojaoad (9,7%)), virsik (10,9%), suhkur, happesuse regulaatorid (sidrunhape, naatriumtsitraadid), stabilisaator (pektiinid), trikalsiumfosfaat, lõhna- ja maitseaine, meresool, antioksüdandid ( tokoferoolirikas ekstrakt, askorbiinhappe rasvhapete estrid), porgandiekstrakt, vitamiinid (B2, B12, D2), jogurtikultuurid ( <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> ).	Energia: 292 kJ / 69 kcal; Rasvad: 2,1 g; millest küllastunud rasvhappeid 0,4 g; monoküllastumata rasvhapped: 0,5 g; polüküllastumata rasvhapped: 1,2 g; Süsivesikud: 8,3 g; millest suhkrud: 8,2 g; Kiudained: 0,9 g; Valk: 3,6 g; Sool: 0,25 g; D-vitamiin: 0,75 µg; B2-vitamiin: 0,21 mg; vitamiin B12: 0,38 µg; Kaltsium: 125 mg
YA5	Alpro Greek Style	Alpro	Sojapõhi (vesi, lüditud sojaoad (15,7%)), suhkur, stabilisaator (pektiinid), kaltsium (trikalsiumtsitraat), happesuse regulaatorid (naatriumtsitraadid, sidrunhape), looduslik lõhna- ja maitseaine, meresool, antioksüdandid ( tokoferoolirikas ekstrakt, askorbiinhappe rasvhapete estrid), vitamiinid (B12, D2), Jogurtikultuurid ( <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> )	Energia: 283 kJ / 68 kcal; Rasvad: 3,3 g; millest küllastunud rasvhappeid: 0,6 g; monoküllastumata rasvhapped: 0,7 g; polüküllastumata rasvhapped: 2 g; Süsivesikud: 2,6 g; millest suhkrud: 2,5 g; Kiudained: 1,5 g; Valk: 5,8 g; Sool: 0,36 g; D-vitamiin: 0,75 µg; E-vitamiin: 1,3 mg; vitamiin B12: 0,38 µg; Kaltsium: 120 mg
SBD	The Dream & Joya Soya Drink Barista	Naturprodukte	Sojapõhi 99% (vesi, sojaoad 7,5%), kaltsiumkarbonaat, stabilisaator: gellaankummi; happeregulaator: kaaliumkarbonaat; vitamiin: D2, vitamiin B12, looduslik lõhna- ja maitseaine, sool	Energiat 144kJ/35 kcal; Rasvad: 1,9 g, millest küllastunud rasvhappeid 0,3 g; Süsivesikud: 0,8 g, millest suhkrud 0,7 g; Kiudained: 0,5 g; Valk 3,3 g; sool 0,11 g; Kaltsium: 120 mg; vitamiin D2 0,75 µg; vitamiin B12 0,38 µg

### 3.1.1. Reagendid

Sojasaponiinide eraldamiseks ja analüüsimiseks kasutati atsetonitrili (MeCN) (HPLC klass,  $\geq 99.9\%$ , Honeywell), metanooli (MeOH) (HPLC klass,  $\geq 99.9\%$ , Honeywell), sipelghapet (FA) (MS klass, 98%, Honeywell), ülipuhas vesi (MQ) (Millipore), etanooli (EtOH)  $\geq 99.8\%$  absoluutne (Honeywell), 2-propanooli (IPA) (HPLC klass,  $\geq 99.9\%$ , Honeywell) ja 25%-list ammooniumilahust (LC-MS klass, Honeywell).

### 3.1.2. Standardid

Proovides sojasaponiinide sisalduse määramiseks standardainetena kasutatud sojasaponiin Aa (MW = 1365,46 g/mol), sojasaponiin Ba (MW = 959,12 g/mol) ja sojasaponiin Bb (MW = 943,12 g/mol) on pärit ettevõttest PhytoLab GmbH & Co. KG (Dutendorfer, Germany) ning sojasaponiin Ab (MW = 1437,5 g/mol) MedChemExpress-ist (NJ, USA).

Sisestandardina kasutati ühendit asperosaponiin VI (MW = 929,1 g/mol), mis pärines samuti ettevõttest PhytoLab GmbH & Co. KG (Dutendorfer, Germany).

## 3.2. Meetodid

### 3.2.1. Metoodika väljatöötamine - proovi ekstraktsioon ja saponiinide määramine

#### Proovi ettevalmistus

Saponiinide ekstraheerimiseks kasutati mõningate muudatustega eelnevalt publitseeritud herne- ja kaeramaatriksile sobilikku meetodit (Bljakhina, Pismennõi, et al., 2023).

Esmalt külmutatud proovid sulatati, homogeniseeriti ning kaaluti kolmes paralleelis 0,35-0,40 g 5 ml mõõtkolbidesse. Mõõtkolvid täideti jooneni ülipuhta veega ja vortekseeriti. Metoodika välja töötamise käigus leiti, et sojasaponiinide kvantifitseerimist mõjutab jogurti alternatiivide esialgne pH – seetõttu muudeti ettevalmistuse käigus ka nende proovide pH-d. Selleks valati proovid mõõtkolbidest üle 15 ml kõrgete pöörete jaoks mõeldud tuubidesse ning kasutades kalibreeritud pH-meetrit viidi pH vahemikku  $8 \pm 0,25$  (jogurti alternatiivide esialgne pH oli umbes 4,6). Reagentidena kasutati vastavalt vajadusele 5%-list ammooniumi vesilahust (v/v) ja 25%-list sipelghappe vesilahust (v/v). Seejärel inkubeeriti proove stabiliseerimiseks 30 min toatemperatuuril tuubirotatoril SB3 (Stuart, UK).



Seejärel proovid tsentrifugeeriti (17000 x g juures, 10 min, temperatuuril 10°C). Seejärel viidi 700 µl proovi supernatanti ja 700 µl puhast MeCN üle uude 1,5 ml Eppendorfi tuubi, vortekseeriti ning tsentrifugeeriti uuesti (14800 x g juures, 10 min, temperatuuril 10°C) sadestunud valkude eraldamiseks. Proovid filtreeriti (1000 µl saadud supernatandist) kasutades -0,5 baarilise rõhu juures vaakumkollektor süsteemi (VacMaster 10, Biotage Sweden AB, Uppsala, Sweden) läbi ISOLUTE® PLD+ kolonni (Biotage Sweden AB, Uppsala, Sweden). See eemaldab proovist järelejäänud valgud ja fosfolipiidid. Viimaks viidi *positive-displacement* pipetiga 1:1 proovi filtraati (100 µl) ja sisestandardi töölahust (Asperosaponiin VI) (100 µl) UPLC viaali ning süstiti LC-MS süsteemi.

### **Hüdofiilse interaktsiooni vedelikkromatograafia-massispektromeetria (HILIC-MS)**

Proove analüüsiti kasutades Waters UPLC® (Waters Corporation, Milford, MA, USA) kromatograafi koos Waters Quattro Premier XE massi-spektromeetriga, mis oli varustatud ZSpray™ Source ionisatsiooniallikaga. Analüüsis kasutatavad mobiilsed faasid koosnesid A) 0,1% sipelghappe vesilahusest (kasutades MQ ultrapuhast vett) ja B) 0,1% sipelghappe lahusest MeCN-is. Seadmes kasutatav nõrk nõela pesulahus (ingl.k. *weak needle wash*) koosnes MeCN lahusest ultrapuhast vees (90%, v/v) ja tugev nõela pesulahus (ingl.k. *strong needle wash*) koosnes IPA lahusest MeCN-is (50%, v/v). Tihendi pesulahuseks (ingl.k. *seal wash*) oli 50%-line MeCN vesilahus(v/v). Proove säilitati automaatses proovivõtjas temperatuuril 8°C ning süstimismahuks oli seatud 2 µl.

Saponiinide eraldamiseks kasutati BEH Amide kolonni (1,0 × 50 mm, 1,7 µm), mis oli ühendatud BEH Amide VanGuardi eelkolonniga (2,1 × 5 mm) ettevõttelt Waters Corporation (Milford, MA, USA). Voolutamise gradient oli järgmine: 0-0,17 min 10% A lahuse ja 90% B lahuse juures; 0,17-1,5 min muutus gradient lineaarselt kasutades 10-70% A lahust ja vastavalt 90-30% B lahust; minutitel 1,5-4,17 oli gradient 70% A lahuse juures; 4,18 minutil lülitati gradient 10% A lahuse juurde ning viimastel 4,18-6,0 minutitel püsis gradient 10% A lahuse juures. Kogu süstimistsükli ajaks kokku oli 6 minutit. Kõigi katsete ajal hoiti kolonni temperatuuri 50 °C juures ning voolukiiruseks oli 200 µl/min.

Analüütide ioniseerimiseks kasutati negatiivse elektropihustusionisatsiooni (ESI) tehnikat. Massi ja laengu suhted saadi ühe iooni salvestuse (ingl.k. *single-ion-recording*) meetodit kasutades. Deprotoneeritud molekulid valiti skanneerimise tüüpi välisstandardite katse põhjal. Kapillaarpingeks seati -2,5 kV ja koonuse pinged määrati iga ühendi jaoks eraldi (tabel 2).

Tabel 2. Analüütide massi/laengu suhted (m/z) ja koonuse pinged

Analüüt	m/z ± 0,5Da	Koonuse pinge (V)
Asperosaponiin VI	927,5	120
Sojasaponiin Aa	1364,3	120
Sojasaponiin Ab	1435,6	120
Sojasaponiin Ba	957,3	120
Sojasaponiin Bb	941,5	100

### Kalibratsioon ja kvantifitseerimine

Kalibreerimiseks vajalikud standardühendite põhilahused (ingl.k. *stocklahused*) saadi järgnevalt: sojasaponiin Aa, sojasaponiin Ab ja sojasaponiin Bb kontsentratsiooniga 1000 mg/L lahused valmistati 99,9%-lise puhtusega etanoolis ning sojasaponiin Ba 1000 mg/L põhilahus valmistati 1:1-le etanool:metanool lahuses (EtOH:MeOH; 1:1, v/v). Sisestandardi (IS) asperosaponiin VI 1000 mg/L lahus valmistati ülipuhtas MQ vees. Kõikidest lahustest tehti alikvoodid, mis säilitati -80°C juures. Enne igat analüüsi valmistati uus IS töölahusena kasutatav 30 mg/L asperosaponiin VI lahus (50%-lises MeCN vesilahuses (v/v)). Kalibratsioonikõvera koostamiseks vajalikud standardlahused lahustati 50% MeCN:36% H<sub>2</sub>O:14% EtOH (v/v) lahuses.

Kvantifitseerimiseks lisati standardlahustele enne HILIC-MS süsteemi süstimist konstantse kontsentratsiooniga 1:1-le IS töölahust. Kõikide sojasaponiinide standardained kokku segades saadi ühekordne lahus, millest valmistati omakorda kaheksa järjestikust lahjendust. Nende järjestikuste lahjenduste näol saadi kalibratsioonilahused (kontsentratsioonivahemikus 0,01-2,5 mg/L). Seejärel koostati igale sojasaponiinile kalibratsioonikõver, nii et iga üksiku sojasaponiini piigi pindala ja sisestandardi piigi pindala vaheline suhe kanti graafiku y-teljele ning välise standardühendi kontsentratsioon x-teljele. Kõikide analüütide korrelatsioonikoeffitsientid leiti lineaarse regressiooni meetodil.

### 3.2.2. Metoodika valideerimise katsete kirjeldus

Välja töötatud sojasaponiinide määramise metoodika valideerimisel tugineti EMA valideerimise juhendmaterjalile. Valideerimise käigus määrati kindlaks metoodika kalibratsioonikõver ja kalibratsiooniulatus, tuvastamiskiir (LOD), kvantifitseerimiskiir (LOQ), selektiivsus, spetsiifilisus/täpsus, kordustäpsus, saagis ja maatriksefekt.

Kalibratsioonikõvera ja -vahemiku hindamiseks mõõdeti korduvalt erineva kontsentratsiooniga sojasaponiinide standardlahuseid, kasutades kaheksat erinevat kalibratsioonipunkti. Kalibratsioonipunktid saadi sojasaponiinide standardaine ühekordsete lahuste järjestikul lahendamisel kuni 128-kordse lahjenduseni. Samuti hinnati lineaarsust (kalibratsiooni parameetreid) residuaalide sobivuse järgi: hinnati, et kalibratsioonikõvera residuaalid jääksid võimalikult võrdselt ülesse ja alla poole x-telge.

LOD ja LOQ arutati välja kasutades varasemalt avaldatud juhendit (Kruve et al., 2015b). Vastavalt juhendi kirjeldusele leiti väärtused standardkõvera madalaima kontsentratsioonipunkti piikide pindalade analüüsimisel saadud standardhälbe (SD) abil: LOD saamiseks korrutati SD 3-ga ja LOQ saamiseks korrutati see 10-ga.

Täpsuse määramise käigus mõõdeti eraldi meetodika päevasisest (ingl.k. *intra-day*) ja päevadevahelist (ingl.k. *inter-day*) kordustäpsust. Päevasisese täpsuse määramiseks süstiti lineaarse ala kõrgeimat punkti tähistavat standardlahust (mis sisaldas kõiki viite standardainet) ja sisestandardit kuus korda ühe päeva jooksul ning päevadevahelise täpsuse jaoks süstiti neid kolme sõltumatu päeva jooksul. Sellega tehti kindlaks süsteemi poolt analüüsitud retsensiooniaegade ja piikide pindalade stabiilsus. Ekstraktsiooni meetodika täpsuse välja selgitamiseks uuriti ka kogu meetodika korratavust (ingl.k. *repeatability*) ja keskmist täpsust. Need analüüsid viidi läbi ühe soja baasil jogurti alternatiiviga - YA2. Meetodika keskmine päevasisene täpsus määrati kindlaks sama proovi YA2 kuue paralleeli analüüsimisega samades katsetingimustes. Keskmise päevadevahelise täpsuse määramiseks teostati katsed kolmel erineval päeval nelja nädala jooksul.

Analüütide kogusaagise (ingl.k. *total recovery*) hindamiseks kasutati ekstraktsioonieelset spaikimist (ingl.k. *pre-extraction spiking*). Selleks lisati YA2 proovimaatriksile neljal erineval kontsentratsioonitasemel teadaolev kogus sojasaponiine. Algseks kontsentratsioonitasemeks oli spaikimata proov, esimese taseme spaikimislahusena kasutati sojasaponiinide segu kontsentratsiooniga alumise LOQ piiri juures, teise taseme spaigilahuse kontsentratsioon oli lineaarse ala keskel ja kolmanda taseme spaikimislahuse segu kontsentratsioon oli ülemise LOQ piiri lähedal. Pärast spaikimist teostati kogusaagise hindamise katset edasi täpselt samamoodi nagu ülalkirjeldatud proovi ekstraktsioonimeetodika kirjelduses välja toodud.

Maatriksefekt (ME) kindlaks määramiseks kasutati ekstraktsioonijärgset spaikimist (ingl.k. *post-extraction spiking*). Selleks lisati pärast ekstraktsiooni proovile originaalse kalibratsioonikõvera standardlahuseid ning konstrueeriti selle põhjal saadud tulemusest uus kalibratsioonikõver. Edasi võrreldi proovide spaikimise põhjal saadud (ingl.k. *matrix-matched*) kalibratsioonikõverat originaalse standardite põhjal saadud (ingl.k. *solvent-matched*) kalibratsioonikõveraga ning arutati kõverate tõusude põhjal välja maatriksefekt. Maatriksefekt arvutust iseloomustab järgmine valem 1:

$$\text{ME (\%)} = \frac{\text{tõus}_{\text{matrix-matched}}}{\text{tõus}_{\text{solvent-matched}}} \times 100\% \quad (1). \quad (\text{Kruve et al., 2015b})$$

### 3.2.3. Andmeanalüüs

HILIC-MS kaudu saadud andmeid analüüsiti ja kvantifitseeriti kasutades Waters MassLynx™ V4.1 (SCN805, Waters Corporation, Milford, MA, USA) ning Microsoft Excel® (Microsoft 365 Apps for enterprise, Microsoft Corporation, Richmond, WA) programme.

Proovi ekstraktsioonimetoodika arendamiseks vajalik andmeanalüüs teostati programmi R 4.2.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Viin, Austria) abil. ANOVA ja Tukey-Krameri post hoc testid viidi läbi kasutades R-i paketti "agricolae" 1.3-5. Tulemused esitati kujul aritmeetiline keskmine  $\pm$  standardhälve (SD). Kõiki teostatud analüüse korrati kolmes korduses.

## 4. Tulemused ja arutelu

### 4.1. Ekstraktsiooni meetoodika välja töötamine

Antud proovi ekstraktsiooni meetoodika välja töötamise aluseks sojasaponiinide määramisel soja baasil jogurti alternatiivides oli varem avaldatud ekstraktsiooni meetoodika saponiinide määramiseks kaera- ja hernebaasil taimsetes jookides (Bljaghina, Pismennõi, et al., 2023).

Tabelis 3 on näha proovi ekstraktsiooni meetoodika arendamise käigus kasutatud soja baasil joogi, SBD, ja kahe jogurti alternatiivi, YA1 ja YA2, analüüsi tulemused. Nimetatud maatrikseid analüüsi eelnevalt kirjeldatud proovi ekstraktsiooni meetoodikat rakendades nii spaikimata kui ka kõigi nelja sojasaponiiniga spaigitud versioonis (spaikimine toimus kolmel erineval kontsentratsioonil). Lisaks toimusid analüüsid erineva pH taseme juures. Alguses analüüsi proove nende natiivse pH juures. pH mõõtmiste tulemusena saadi teada, et analüüsis kasutatava soja baasil joogi pH-ks on 8,8 ning soja baasil jogurti alternatiivide pH väärtused jäävad vahemikku 4,6 - 4,7. Analüüsi käigus selgus, et sojajoogi ja soja baasil jogurtialternatiivide loomuliku pH juures on sojasaponiinide saagised väga varieeruvad. Meetoodika arenduses kasutatava soja baasil joogi saagis oli vahemikus 80-109% natiivse pH juures, kuid jogurti alternatiivide saagised natiivse pH juures ulatusid 19% kuni 63%-ni, mis ei olnud aktsepteeritav tulemus. Koostiscomponentide osas on soja baasil jook ja jogurti alternatiivid küll väga sarnased, kuid saagise suur erinevus tuleneb proovide erinevast pH-tasemest (vt toitumisalase koostise infot tabelis 1).

Tabel 3. Sojasaponiinide saagise (R) sõltuvus proovi pH väärtusest. Proovideks on SBD ehk soja baasil jook (inglise keeles *soybean-based drink*) ning YA1 ja YA2 ehk soja baasil jogurti alternatiivid (inglise keeles *soybean-based yoghurt alternatives*). Iga keskmine tulemus on esitatud koos  $\pm$  standardhälbega (SD) (n=3). ANOVA statistilise erinevuse testi tulemused on väljendatud eri tähtedega proovide keskmiste tulemuste järel: erineva tähega keskmiste tulemuste vahel esineb statistiline erinevus (maatriksite siseselt) p-väärtuse <0,05 juures. Spaikimislahuste kontsentratsioonid on valitud vastavalt iga analüüdi lineaarse ala ulatusele, jäädes ülemise LOQ piiri lähedale.

Proov	pH	Sojasaponiin Aa		Sojasaponiin Ab		Sojasaponiin Ba		Sojasaponiin Bb	
		mg/100g	R <sup>1</sup> (%)	mg/100g	R <sup>2</sup> (%)	mg/100g	R <sup>3</sup> (%)	mg/100g	R <sup>4</sup> (%)
SBD	8,8 (natiivne)	<LOQ	85 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	<LOQ	80 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	2,43 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	12,6 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
	4,2 $\pm$ 0,2	<LOQ	54 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	<LOQ	51 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	0,82 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	26 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	23 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
YA1	4,7 (natiivne)	<LOQ	43 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	0,58 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	41 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	0,56 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	0,84 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	20 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	7,0 $\pm$ 0,2	<LOQ	104 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	1,82 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	115 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	1,03 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	109 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	5,39 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
YA2	4,6 (natiivne)	<LOQ	48 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	3,07 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	0,54 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 1 <sup>c</sup>	1,3 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 2 <sup>c</sup>
	7,0 $\pm$ 0,2	<LOQ	91 $\pm$ 7 <sup>ab</sup>	8,09 $\pm$ 0,38 <sup>ba</sup>	98 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	83 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	10,94 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	85 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
	7,5 $\pm$ 0,2	<LOQ	86 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	9,93 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup>	103 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	2,68 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	102 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>	13,63 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 4 <sup>ab</sup>
	8,0 $\pm$ 0,2	<LOQ	107 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	9,18 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	110 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	2,54 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	114 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	14,43 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 14 <sup>ab</sup>
	8,5 $\pm$ 0,2	<LOQ	74 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	9,01 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	2,79 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	99 $\pm$ 8 <sup>ab</sup>	13,51 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	111 $\pm$ 1 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Sojasaponiin Aa spaikimislahuse kontsentratsioon on 1,91 mg/L. <sup>2</sup>Sojasaponiin Ab spaikimislahuse kontsentratsioon on 2,30 mg/L. <sup>3</sup>Sojasaponiin Ba spaikimislahuse kontsentratsioon on 1,86 mg/L. <sup>4</sup>Sojasaponiin Bb spaikimislahuse kontsentratsioon on 2,10 mg/L

Saadud tulemuste põhjal tekkis hüpotees, et proovi pH avaldab mõju sojasaponiinide saagisele. Hüpoteesi testimiseks viidi läbi lisakatseid erinevate pH väärtuste juures. Sojajoogi pH muudeti happeliseks ning jogurti alternatiivide pH-d aluseliseks – nii, et proovid jäljendaksid üksteise pH väärtuseid. Selle katse käigus selgus, et sojajoogi puhul jäi sojasaponiinide saagis pH 4,2 juures vahemikku 23% kuni 54% (tabel 3), mis ei ole aktsepteeritav meetodika saagis. Jogurti alternatiivide sojasaponiinide saagised vastupidiselt aga pH 7,0 ± 0,2 juures tõusid, jäädes YA1 puhul 77% ja 115% vahele ning YA2 puhul vahemikku 83-98% (tabel 3). Seega võib tulemusena öelda, et pH omab mõju sojasaponiinide ekstrahatsioonile. Samuti avaldas pH mõju kvantifitseeritud proovide ehk spaikimata proovide sojasaponiinide väärtusele – seetõttu oligi vajalik katsed läbi viia ekstrahatsioonieelse spaikimise abil, et näha, kas leidub mingeid aspekte, mis võiks analüüdi kogusaagist mõjutada.

Saadud tulemustele tuginedes teostati katsed leidmaks parima (100% lähedane saagis, SD ± 10%) sojasaponiinide saagiseprotsendiga pH väärtus soja baasil jogurti alternatiivide jaoks. Selleks katseks kasutati YA2 jogurti alternatiivi, mida uuriti kolmes erinevas pH vahemikus: pH 7,5 ± 0,2; pH 8,0 ± 0,2 ja pH 8,5 ± 0,2 juures. Katse käigus saadud tulemused on toodud tabelis 3. ANOVA statistilise analüüsi käigus leiti enamuse analüüsitud pH vahemike vahel maatriksite siseselt statistiline erinevus. Kõige aktsepteeritavamad olid saagised pH 7,5 ± 0,2 juures ja vahemikus 8,0 ± 0,2. Katse tulemusena on näha, et pH väärtustel 7-8,5 on sojasaponiinide saagisele positiivne mõju. Katse käigus ei ilmnenud rangelt sobivat pH vahemikku. Meetodi optimaalseks pH väärtuseks valiti saadud katsetulemuste ja varasema kirjandusliku info põhjal 8,0 ± 0,25. Shimoyamada et al., (1993) on leidnud, et sojasaponiin Bb lahustuvus tõuseb hüppeliselt vesilahustes pH väärtuste 6,5-7,3 juures – seega võib arvata, et pH avaldab mõju sojasaponiinide lahustuvusele ning mõjutab seeläbi ka sojasaponiinide saagist. Selgus, et mida väiksem on sojasaponiini lahustuvus solvendis, seda madalam on selle saagis.

## 4.2. Metoodika valideerimise tulemused

Sojasaponiinide analüüsimetoodika välja töötamise järgselt teostati selle valideerimine. Valideerimise käigus määrati kindlaks metoodika lineaarne vahemik, LOD, LOQ, täpsus, saagis ja maatriksefekt, tundlikkus ja spetsiifilisus.

Kasutades sojasaponiinide standardlahuseid valideeriti metoodika kalibratsiooniparameetrid. Kõikidel neljal sojasaponiinide standardil oli kontsentratsioonivahemikus 0,01-2,52 mg/L kõrge lineaarsus, ulatudes üle 0,99 väärtuse ( $R^2 > 0,99$ ). Samuti paigutusid residuaalid juhuslikult ning jäid järgmistesse piiridesse – kõige madalamas punktis kuni 20%, üldiselt kuni 15%. Kõiki kalibratsioonilahuseid süstiti 3 korda ning arvesse võeti kõiki kordussüstimisi. Kalibratsioonikõverad loodi programmi Excel® ning QuanLynx® (MassLynx®'i osa) abil kasutades kaalutud 1/x lineaarset regressiooni. Sojasaponiinide eeldatavad LOQ väärtused olid  $\leq 33,4$   $\mu\text{g/L}$  ning saadud tulemused jäid soovitud piiridesse. Sojasaponiin Aa puhul oli LOQ  $\leq 27,0$   $\mu\text{g/L}$ ; sojasaponiin Ab puhul  $\leq 25,1$   $\mu\text{g/L}$ ; sojasaponiin Ba LOQ oli  $\leq 33,4$   $\mu\text{g/L}$  ning sojasaponiin Bb LOQ oli  $\leq 12,6$   $\mu\text{g/L}$ . Kalibratsiooniparameetrid on välja toodud tabelis 4.

Tabel 4. Sojasaponiinide lineaarne ala, kalibratsioonikõver, determinatsioonikordaja/R-ruudus ( $R^2$ ), tuvastamispiir (LOD) ja kvantifitseerimispiir (LOQ)

Analüüt	Lineaarne ala (mg/L)	Kalibratsioonikõver	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
Sojasaponiin Aa	0,02 - 2,33	$y = 0,3994x + 0,0021$	0,9965	7,0	27,0
Sojasaponiin Ab	0,01 - 2,48	$y = 0,3259x + 0,0033$	0,9943	1,4	25,1
Sojasaponiin Ba	0,02 - 2,26	$y = 0,2949x + 0,0025$	0,9975	8,0	33,4
Sojasaponiin Bb	0,01 - 2,52	$y = 0,7699x + 0,0048$	0,9930	0,2	12,6

Standardite põhjal tehti kindlaks ka metoodika täpsus ja kordustäpsus. Nende parameetrite valideerimist teostati pärast sojasaponiinide lineaarsuse sobivuse kindlustamist. Standardite alusel määrati piikide retentsiooniaegade (RT) ja pindalade suhtelised standardhälved (RSD) – RT puhul jäi RSD alla 2% ning pindalade puhul alla 4%. Samuti analüüsiti kogu metoodika päevasise ja päevadevahelise täpsuse RSD, mis jäi aktsepeeritavuse piiridesse (kuni 15%), olles  $\leq 12\%$ . Saadud tulemused on näidatud tabelis 5.



Tabel 5. Retentsiooniaegade ja pindalade kordustäpsus ning kogu meetodika täpsus

Analüüt	m/z	RT (min)	RT RSD (%)		Piigi pindala RSD (%)		Täpsuse <sup>1</sup> RSD (%)	
			Päevisisene (n=6)	Päevadevaheline (n=18)	Päevisisene (n=6)	Päevadevaheline (n=3)	Päevisisene (n=6)	Päevadevaheline (n=3)
Sojasaponiin Aa	1364,3	1,3	0,16	0,5	0,96	2,2	*	*
Sojasaponiin Ab	1435,6	1,28	0,37	0,6	0,19	3,5	4	12
Sojasaponiin Ba	957,3	1,32	0,7	0,8	1,73	2	5	12
Sojasaponiin Bb	941,5	1,28	0,03	0,7	1,33	1,1	6	11
Asperosaponiin VI	927,5	1,34	0,1	1,5	3,88	3	-	-

<sup>1</sup>Kogu meetodika täpsus. \*Sojasaponiini Aa sisaldus oli alla LOQ väärtuse. - Asperosaponiin VI on sisestandard ja selle täpsust ei mõõdetud.

Valideerimistulemused sojasaponiinide kogusaagiste kohta saadi proovide ekstraktsiooneelse spaikimise analüüsimisel. Kindlaks tehti sojasaponiinide saagised neljal erineval kontsentratsioonitasemel, seehulgas kolmel spaikimise tasemel. Saadud saagised jäid vahemikku 81-101%, mis olid vastavalt kasutatavale EMA juhendmaterjalile vastuvõetavad tulemused (80-110%).

Samuti määrati uuritavate proovide analüüsil meetodikat mõjutava maatriksefkti ulatus, kasutades ekstraktsioonijärgset spaikimist. Katse põhjal saadi sojasaponiinide maatriksefkti ulatusteks järgmised tulemused: sojasaponiin Aa – 99%, sojasaponiin Ab – 94%, sojasaponiin Ba – 94% ja sojasaponiin Bb – 91%. Need tulemused jäävad maatriksefkti valideerimiseks vajalikesse piiridesse (90-110%). Sojasaponiinide saagise analüüsi tulemused väljenduvad tabelis 6.

Tabel 6. Sojasaponiinide saagised soja baasil jogurti alternatiivides<sup>1</sup>

Spaikimise tase	Sojasaponiin Aa <sup>2</sup>		Sojasaponiin Ab <sup>3</sup>		Sojasaponiin Ba <sup>4</sup>		Sojasaponiin Bb <sup>5</sup>	
	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)	mg/L	R (%)
L1	0,02	101 ± 9	0,03	96 ± 3	0,02	97 ± 5	0,03	95 ± 4
L2	0,62	81 ± 1	0,8	90 ± 2	0,68	87 ± 3	0,77	87 ± 4
L3	1,23	81 ± 0	1,61	88 ± 0	1,36	86 ± 2	1,54	82 ± 2

<sup>1</sup>Tulemused on esitatud kujul aritmeetiline keskmine (*mean*) ± SD (n=3). <sup>2</sup>Spaikimata maatriksi sojasaponiin Aa kontsentratsioon on 0,03 mg/L. <sup>3</sup>Spaikimata maatriksi sojasaponiin Ab kontsentratsioon on 0,72 mg/L. <sup>4</sup>Spaikimata maatriksi sojasaponiin Ba kontsentratsioon on 0,27 mg/L. <sup>5</sup>Spaikimata maatriksi sojasaponiin Bb kontsentratsioon on 0,99 mg/L.

Nende parameetrite valideerimisega on tagatud meetodika piisav saagis, täpsus, tundlikkus ja spetsiifilisus, maatriksefekt, LOD, LOQ ja lineaarsus. Valideerimise tulemusena antud meetodikat nüüd võimalik ja sobilik kasutada ka rutiinsetes analüüsides.

### 4.3. Sojasaponiinide sisaldus uuritavates soja baasil jogurti alternatiivides

Pärast ekstraktsiooni meetodika väljatöötamist ja valideerimist kvantifitseeriti sama meetodika abil viies erinevas soja baasil jogurti alternatiivis sojasaponiinide sisaldus. Kvantifitseerimise tulemused on näha tabelis 7. Analüüsi tulemusena selgus, et kõikidel analüüsitud jogurti alternatiivide proovidel olid sarnased sojasaponiinide sisaldused.

Tabel 7. Sojasaponiinide sisaldused (mg/100g) analüüsitud soja baasil jogurti alternatiivides<sup>1</sup>

Proov	Sojasaponiin Aa (mg/100g)	Sojasaponiin Ab (mg/100g)	Sojasaponiin Ba (mg/100g)	Sojasaponiin Bb (mg/100g)
YA1	*	3,5 ± 0,4	2,8 ± 0,2	14,5 ± 0,4
YA2	*	7,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2	11,9 ± 0,8
YA3	*	8,5 ± 0,4	4,0 ± 0,4	12,6 ± 0,5
YA4	*	2,7 ± 0,3	2,6 ± 0,1	11,7 ± 0,4
YA5	*	4,5 ± 0,5	4,2 ± 0,6	13,3 ± 1,0

<sup>1</sup>Iga keskmise tulemusega koos on esitatud ± SD (n=3). \*Sojasaponiini Aa sisaldus oli alla LOQ väärtuse.

Tulemustest on näha, et kõikide proovide puhul jäi sojasaponiin Aa sisaldus alla meetodi kvantifitseerimispiiri (<LOQ). Eelneva põhjal võib öelda, et uuritud soja baasil jogurti alternatiivide proovid ei sisalda üldse sojasaponiin Aa-d. Seega juhul kui nende proovide puhul esineb mõruidaid maitseomadusi, võiks arvata, et põhjuseks on sojasaponiin Ab esinemine ning probleemi lahendamist tuleks alustada just sealt.

Teiste kvantifitseeritud sojasaponiinide kontsentratsioonid proovides olid kõrgemad ning tõusid vastavalt: sojasaponiin Ba, sojasaponiin Ab ning kõige kõrgemaid sisaldusi andis sojasaponiin Bb. Sojasaponiin Ba sisaldused jäid vahemikku 2,6-4,2 mg/100g; sojasaponiin Ab kontsentratsioonid varieerusid 2,7-8,5 mg/100g vahel ning sojasaponiin Bb tulemused proovides olid vahemikus 11,7-14,5 mg/100g (tabel 7).

Hiljuti avaldatud uuringus, kus analüüsiti 39-s proovis, sealhulgas 14-s soja baasil piimatoote proovis, sojasaponiinide sisaldust leiti, et sojasaponiin Aa sisaldus jäi sojapiima proovides alla LOQ taseme, sojasaponiin Ab sisaldus oli vahemikus 1 kuni 44 mg/100g kuivaine kohta (KA), sojasaponiin Ba sisaldused olid kuni 14 mg/100g KA ning sojasaponiin Bb kontsentratsioonivahemik oli 27-308 mg/100g KA (Chitisankul et al., 2021). Arvestades eelnevalt toodud tulemuste võrdlemisel ka käesoleva uuringu proovide kuivaine sisaldusega (milleks oli umbes 11%), võib väita, et saadud tulemused on arvestatavad ja heas vastavuses. Lisaks on teise, Jaapani toitudes sojasaponiinide sisaldust analüüsinud uuringu tulemusena saadud, et soja baasil piimaalternatiivi keskmine kogu sojasaponiinide kontsentratsioon on 39 µmol/100g (Kamo et al., 2014). Käesoleva analüüsi tulemusena saadi keskmiseks soja baasil jogurti alternatiivide kogu sojasaponiinide kontsentratsiooniks 21 µmol/100g. Seega võib nende andmete põhjal antud uuringu tulemusi realistlikeks pidada ning väita, et saadud tulemused kinnitavad eelnevaid uuringuid, kui võtta arvesse veel ka erinevaid kasutatud meetodeid ning võimalikke erinevaid soja tüüpe.

Välja töötatud meetodika tulemusena on võimalik määrata sojasaponiinide sisaldust soja baasil jogurti alternatiivides, kasutades selleks HILIC-MS süsteemi. Meetodika on sobilik kasutamiseks ainult vedelate proovide korral ning samuti on meetodika limiteeritud oma pH-st sõltuvuse poolest. Selleks, et oleks võimalik sojasaponiine kvantifitseerida, on happeliste proovide korral vajalik need enne proovi ekstrahatsiooni aluselise pH juurde viia.

Seda meetodikat on edaspidi võimalik kasutada nii toote- kui ka teadusarenduses. Meetodika annab võimaluse teha kindlaks sojast jogurti alternatiivides saponiinide sisaldust ning aitab potentsiaalselt kaasa mõruda kõrvalmaitse elimineerimisele. Samuti võib meetodikat kasutada teist tüüpi toorainega taimsetes piimaalternatiivides sojasaponiinide määramisel (nt võiksid sobida erinevad oa- ja hernemaatriksid või läätsed). Teaduses saaks seda meetodikat arendada uurimaks saponiinide võimet pärssida mõnede vitamiinide ja mineraalainete imendumist.

## 5. Järeldused

1. Töö olulisema tulemusena leiti, et soja baasil jogurti alternatiivide natiivne pH avaldab mõju sojasaponiinide saagisele:
  - 1.1. Aluseline pH avaldab saagisele positiivset mõju – soja baasil joogi saagiseprotsent natiivse pH 8,8 juures oli vahemikus 80-109%; jogurti alternatiivi pH muutmisel 4,6-4,7 juurest pH  $7,0 \pm 0,2$  tasemele, tõusis nende saagis YA 1 puhul 77% ja 115% vahele ning YA 2 puhul 83% ja 98% vahele. Happeline pH avaldab saagisele mitteaktsepteeritavat mõju – soja baasil jogurti alternatiivide saagiseprotsendid natiivse pH 4,6-4,7 juures ulatusid 19%-st kuni 63%-ni ning sojajoogi pH viimisel 8,8 juurest pH tasemele 4,2 langes selle saagis 23% ja 54% vahele, mis ei ole aktsepteeritavad tulemused.
  - 1.2. Tulemustest järeldati, et pH väärtustel 7-8,5 on positiivne mõju sojasaponiinide saagisele – sellest lähtudes ning arvestades kirjandusliku allikaga leiti sojasaponiinide saagise seisukohalt optimaalseks pH väärtuseks  $8,0 \pm 0,25$ .
2. Välja töötatud meetodika võimaldab nüüd määrata saponiinide sisaldust vedelast proovist otse, ilma selle eelneva lüofiliseerimiseta – nii on võimalik hoida kokku aega ja laboriressursse.
3. Välja töötatud sojasaponiinide määramise meetodika valideerimisega tagati meetodika piisav saagis, täpsus, tundlikkus, spetsiifilisus, maatriksefekt, LOD, LOQ ja lineaarsus – seega on meetodika nüüd sobilik rutiinaanalüüsides kasutamiseks.

## Kokkuvõte

Soja ning soja baasil tooted on jätkuvalt üheks populaarseimaks toidukultuuriks taimsete alternatiivide maailmas. Paraku võib nendes sisalduvate saponiinide kibe maitse saada otsustavaks faktoriks tarbija toidukäitumise kujundamisel. Sügavamad teadmised sojasaponiinide analüüsimise ja detekteerimise kohta võimaldavad toiduteadlastel ja ka tootjatel pakkuda lahendusi olulisele probleemile. Seeläbi aidates kaasa ka keskkonna ja rahvastiku toidulaua parandamisele.

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli laborisiseselt arendada välja ning valideerida proovi ekstraktsiooni meetodika sojasaponiinide määramiseks soja baasil jogurti alternatiivides, et kindlustada meetod edasiste sojasaponiinide rutiinanalüüside teostamiseks. Antud töös kasutati sojasaponiinide analüüsimiseks HILIC-MS süsteemi. Välja töötatud meetodikaga analüüsiti proovide sojasaponiin Aa, sojasaponiin Ab, sojasaponiin Ba ja sojasaponiin Bb sisaldust.

Töö tulemused näitasid, et sojasaponiinide sisaldust mõjutab oluliselt jogurti alternatiivi natiivne pH tase. Lisaks selgus, et uuritavates proovides esines peamiselt sojasaponiin Bb ning selle sisaldused varieerusid vahemikus  $11,7 \pm 0,4$  mg/100 g kuni  $14,5 \pm 0,4$  mg/100 g. Katsed näitasid, et sojasaponiini Aa soja baasil jogurti alternatiivides ei leidu – selle tase oli alla LOQ väärtuse.

Töö eesmärk täitus – töötati välja efektiivne proovi ekstraktsiooni meetodika soja baasil jogurtites sojasaponiinide määramiseks. Uurimistööd on võimalik tulevikus praktikasse rakendada nii toidutootjate kui ka teadlaste vaatepunktist – sojasaponiinide määramine on vajalik tootearenduses, aga ka uute sarnaste uurimuste teostamiseks. Välja arendatud meetodikat saaks tulevikus rakendada ka teistes vedelates saponiini sisaldavates maatriksites sojasaponiinide määramiseks.

## Abstract

Soy and soy-based products continue to be one of the most popular food crops in the world of plant-based alternatives. Unfortunately, the bitter taste of the saponins contained in them can become a decisive factor in shaping the consumer's eating behavior. Deeper knowledge about the analysis and detection of soyasaponins allows food scientists and also manufacturers to offer solutions to an important problem. Thereby contributing to the improvement of the environment and the food supply of the population.

The aim of this research was to develop and validate a sample extraction method for the determination of soyasaponins in soy-based yoghurt alternatives in the laboratory, in order to secure a method for further routine analysis of soyasaponins. In this work, the HILIC-MS system was used to analyze soyasaponins. The developed method was used to analyze the content of soyasaponin Aa, soyasaponin Ab, soyasaponin Ba and soyasaponin Bb in the samples.

The results of the work showed that the content of soyasaponins is significantly influenced by the native pH level of the yoghurt alternative. In addition, it was revealed that soyasaponin Bb was mainly present in the studied samples, and its contents varied from  $11.7 \pm 0.4$  mg/100 g to  $14.5 \pm 0.4$  mg/100 g. Tests showed that soyasaponin Aa was not found in soy-based yoghurt alternatives - its level was below the LOQ value.

The goal of the work was fulfilled - an effective sample extraction method was developed for the determination of soyasaponins in soy-based yogurts. Research work can be put into practice in the future from the point of view of both food producers and researchers - the determination of soyasaponins is necessary for product development, but also for conducting new similar research. The developed method could also be applied in the future to determine soyasaponins in other saponin-containing liquid matrices.

## **Tänuavaldused**

Soovin tänada oma juhendajat Anastassia Bljahhinat lõputöö teema välja pakkumise ning igal ajal nõu ja jõuga aitamise eest. Samuti tänan kogu TFTA-i analüütika osakonda mind enda sekka vastuvõtmast ja alati küsimuste korral abistamast.

Uurimistöõ finantsilist poolt toetasid Euroopa Regionaalarengu Fond (ERF) ja Eesti Teadusagentuur (ETAG) projekti ResTA16 kaudu.

## Kasutatud kirjandus

- Akusu OM & Wordu GO. (2017). Production and Evaluation of Composite Soymilk Yoghurt. *Indian Journal of Nutrition*, 2017. <https://www.opensciencepublications.com/fulltextarticles/IJN-2395-2326-4-168.html>
- Amphipathic—Definition and Examples—Biology Online Dictionary*. (2019). Biology Articles, Tutorials & Dictionary Online. <https://www.biologyonline.com/dictionary/amphipathic>
- Aziz, M. M. A. E., Melad, A. S. G., & Ashour, Aziza Said. (2019). A review on saponins from medicinal plants: Chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research, Volume 7*(Issue 4). <https://doi.org/10.15406/jnmr.2019.07.00199>
- Bljahhina, A., Kuhtinskaja, M., & Kriščiunaite, T. (2023). Development of Extraction Method for Determination of Saponins in Soybean-Based Yoghurt Alternatives: Effect of Sample pH. *Foods*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods12112164>
- Bljahhina, A., Pismennõi, D., Kriščiunaite, T., Kuhtinskaja, M., & Kobrin, E.-G. (2023). Quantitative Analysis of Oat (*Avena sativa* L.) and Pea (*Pisum sativum* L.) Saponins in Plant-Based Food Products by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Foods*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods12050991>
- Boersema, P. J., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2008). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—A powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Chen, T., Yao, Q., Nasaruddin, R. R., & Xie, J. (2019). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Powerful Platform for Noble-Metal Nanocluster Analysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(35), 11967–11977. <https://doi.org/10.1002/anie.201901970>
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.057>
- Chitisankul, W. T., Itabashi, M., Son, H., Takahashi, Y., Ito, A., Varayanond, W., & Tsukamoto, C. (2021). Soyasaponin composition complexities in soyfoods relating nutraceutical properties and undesirable taste characteristics. *LWT*, 146, 111337. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111337>
- Cornell University Department of Animal Science*. (2019). <https://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/saponin.html>, (06.04.2023).
- Decroos, K., Vincken, J.-P., Heng, L., Bakker, R., Gruppen, H., & Verstraete, W. (2005). Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1072(2), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.021>
- Dhakal, D., Younas, T., Bhusal, R. P., Devkota, L., Henry, C. J., & Dhital, S. (2023). Design rules of plant-based yoghurt-mimic: Formulation, functionality, sensory profile and nutritional value. *Food Hydrocolloids*, 142, 108786. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108786>
- Huang, K., Liu, Y., Zhang, Y., Cao, H., Luo, D., Yi, C., & Guan, X. (2022). Formulation of plant-based yoghurt from soybean and quinoa and evaluation of physicochemical, rheological, sensory and

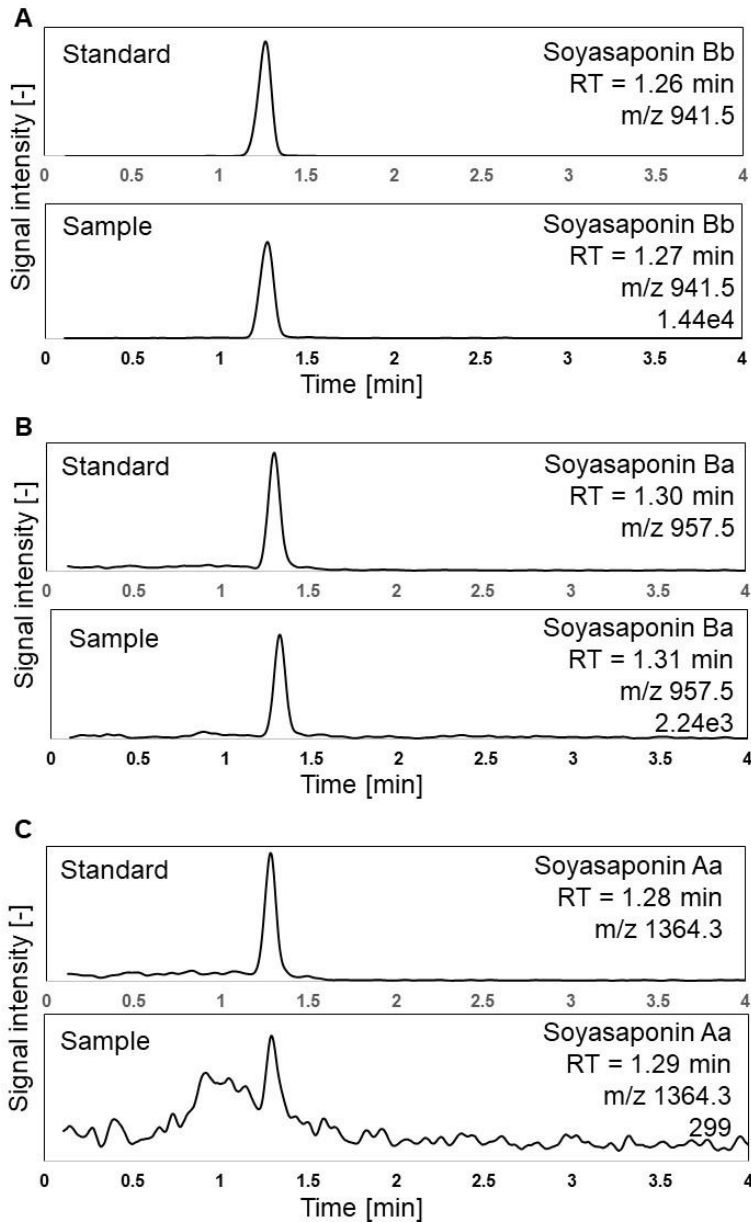


- functional properties. *Food Bioscience*, 49, 101831. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101831>
- Huber, L. (1998). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Taylor & Francis.
- Johnson, L. A., White, P. J., & Galloway, R. (2015). *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*. Elsevier.
- Kamo, S., Suzuki, S., & Sato, T. (2014). The content of soyasaponin and soyasapogenol in soy foods and their estimated intake in the Japanese. *Food Science & Nutrition*, 2(3), 289–297. <https://doi.org/10.1002/fsn3.107>
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015a). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870, 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015b). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, 870, 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>
- Ligor, M., Ratiu, I.-A., Kielbasa, A., Al-Suod, H., & Buszewski, B. (2018). Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *ELECTROPHORESIS*, 39(15), 1860–1874. <https://doi.org/10.1002/elps.201700431>
- Montemurro, M., Pontonio, E., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2021). Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. *Foods*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/foods10020316>
- PubChem. (2023a). (2S,3S,4S,5R,6R)-6-[[[(3S,4S,4aR,6aR,6bS,8aR,9R,12aS,14aR,14bR)-9-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-4,6a,6b,8a,11,11,14b-heptamethyl-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-tetradecahydricipen-3-yl]oxy]-5-[(2S,3R,4S,5R,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]oxy]-3,4-dihydroxyoxane-2-carboxylic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91973815>, (04.04.2023).
- PubChem. (2023b). *Soyasaponin Aa*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14186205>, (04.04.2023).
- PubChem. (2023c). *Soyasaponin I*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122097>, (04.04.2023).
- PubChem. (2023d). *Soyosaponin Ab*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/102004833>, (04.04.2023).
- Qin, P., Wang, T., & Luo, Y. (2022). A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100265. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>
- Rai, S., Acharya-Siwakoti, E., Kafle, A., Devkota, H. P., & Bhattarai, A. (2021). Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/sci3040044>
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 129, 115913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Saponins: Properties, Applications and as Insecticides: A Review. *Bioscience trends*, 8, 1–14.
- Sagrati, G., Caprioli, G., Maggi, F., Font, G., Giardinà, D., Mañes, J., Meca, G., Ricciutelli, M., Sirocchi, V., Torregiani, E., & Vittori, S. (2013). Determination of Soyasaponins I and  $\beta$ g in Raw and Cooked Legumes by Solid Phase Extraction (SPE) Coupled to Liquid Chromatography (LC)–Mass

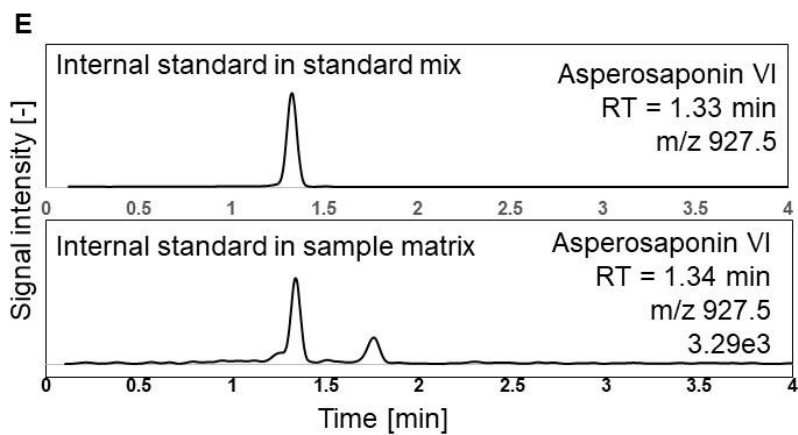
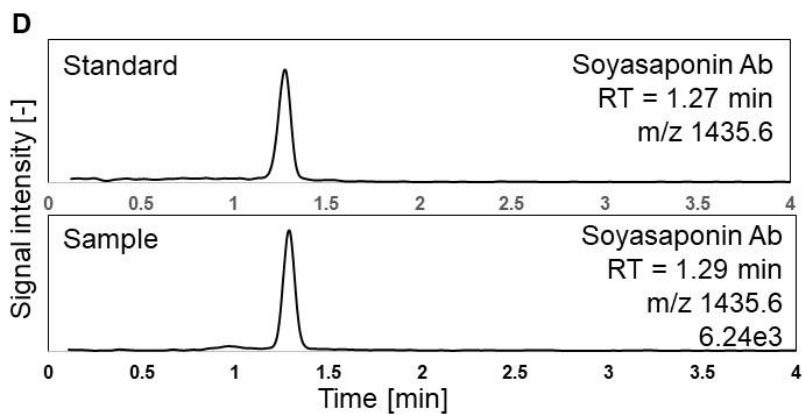
- Spectrometry (MS) and Assessment of Their Bioaccessibility by an in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1702–1709. <https://doi.org/10.1021/jf304136g>
- Samtiya, M., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: An overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>
- Sharma, K., Kaur, R., Kumar, S., Saini, R. K., Sharma, S., Pawde, S. V., & Kumar, V. (2023). Saponins: A concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chemistry Advances*, 2, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100191>
- Shi, J., Xue, S. J., Ma, Y., Li, D., Kakuda, Y., & Lan, Y. (2009). Kinetic study of saponins B stability in navy beans under different processing conditions. *Journal of Food Engineering*, 93(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.035>
- Shimoyamada, M., Osugi, Y., Shiraiwa, M., Okubo, K., & Watanabe, K. (1993). Solubilities of Soybean Saponins and Their Solubilization with a Bisdesmoside Saponin. *NIPPON SHOKUJIN KOGYO GAKKAISHI*, 40(3), 210–213. <https://doi.org/10.3136/nskkk1962.40.210>
- Singh, B., Singh, J. P., Singh, N., & Kaur, A. (2017). Saponins in pulses and their health promoting activities: A review. *Food Chemistry*, 233, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.161>
- Sundaramoorthy, J., Park, G. T., Mukaiyama, K., Tsukamoto, C., Chang, J. H., Lee, J.-D., Kim, J. H., Seo, H. S., & Song, J. T. (2018). Molecular elucidation of a new allelic variation at the Sg-5 gene associated with the absence of group A saponins in wild soybean. *PLOS ONE*, 13(1), e0192150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192150>
- Takada, Y., Sasama, H., Sayama, T., Kikuchi, A., Kato, S., Ishimoto, M., & Tsukamoto, C. (2013). Genetic and chemical analysis of a key biosynthetic step for soyasapogenol A, an aglycone of group A saponins that influence soymilk flavor. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(3), 721–731. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2013-5>
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis: (IUPAC Technical Report)* [Data set]. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/iupac.74.0084>
- U.S. Food and Drug Administration. (2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/media/81810/download>
- Yates, P. S., Roberson, J., Ramsue, L. K., & Song, B.-H. (2021). Bridging the Gaps between Plant and Human Health: A Systematic Review of Soyasaponins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(48), 14387–14401. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04819>

## Lisad

### Lisa 1. Välisstandardite ja YA1 proovi (SIR; ESI-) LC-MS kromatogrammid: (A) sojasaponiin Bb, (B) sojasaponiin Ba, (C) sojasaponiin Aa, (D) sojasaponiin Ab ja (E) sisestandard asperosaponiin VI LC-MS kromatogrammid



**Lisa 1 järg. Välisstandardite ja YA1 proovi (SIR; ESI-) LC-MS kromatogrammid: (A) sojasaponiin Bb, (B) sojasaponiin Ba, (C) sojasaponiin Aa, (D) sojasaponiin Ab ja (E) sisestandard asperosaponiin VI LC-MS kromatogrammid**



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

Mina, Kristina Joarand

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Ekstraktsiooni meetodika väljatöötamine saponiinide määramiseks soja baasil jogurti alternatiivides,“ mille juhendaja on Anastassia Bljahhina,

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.

30.05.2023

---

<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 loomingu 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.