

Tallinna Reaalkool

Kapillaartsoonelektroforeetilise meetodi väljatöötamine
toidu lisaainete analüüsiks jookides

Uurimistöo

Koostaja: Maria-Liesbeth Kaitsa

11 A

Juhendaja: Tallinna Ülikooli prof Ruth Shimmo

Tallinn 2010

Sisukord

Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduslik ülevaade	6
1.1. Toidu lisaained	6
1.1.1. Säilitusained	7
1.1.1.1. Bensoaadid.....	8
1.1.1.2. Askorbiinhape	9
1.1.2. Toiduvärvid.....	10
1.1.2.1. Erkpunane 4R.....	10
1.1.2.2. Patentsinine V	11
1.1.2.3. Tartrasiin	12
1.1.3. Tehislikud magustajad.....	12
1.1.3.1. Aspartaam	13
1.1.3.2. Atsesulfaam K.....	14
1.2. Kasutatavad analüüsimeetodid.....	15
1.2.1. Vedelikkromatograafia.....	15
1.2.2. Kapillaarelektroforees.....	16
1.2.2.1. Kapillaartsoonelektroforeesi tööpõhimõte	17
1.2.2.2. Kapillaartoru siseseina katmine	19
1.2.2.3. Kapillaartsoonelektroforeesi seade	20
1.2.3. Analüüsimeetodite võrdlus	20
2. Materjalid ja meetodikad.....	22
2.1. Reaktiivid ja võrdluspreparaadid	22
2.2. Aparatuur, tarkvara ja materjalid.....	23

2.3. Metoodikad.....	23
2.3.1. Standardlahuste valmistamine	23
2.3.2. Puhversüsteemide valmistamine.....	24
2.3.3. Kunstliku segu valmistamine.....	24
2.3.4. Proovi ettevalmistus	24
2.3.5. Kapillaartsoonelektroforeetiline analüüs.....	24
2.3.5.1. Kapillaari katmine.....	25
2.3.6. Lisaainete identifitseerimine.....	25
3. Tulemused ja arutelu	26
3.1. Puhversüsteemi valik	26
3.2. Lainepikkuste varieerimine	29
3.3. Analüüs kaetud kapillaariga.....	32
3.4. Kapillaartsoonelektroforeesi rakendamine reaalse proovide analüüsis	34
3.5. Kvantitatiivne analüüs.....	37
Kokkuvõte	42
Kasutatud materjalid.....	44
Lisa 1 Elektroferogrammid	48
Lisa 2 Kalibratsioonigraafikud	50
Lisa 3 Tabelid.....	53

Sissejuhatus

Toidu lisaainete kasutusala on tänapäeva toiduainetööstuses väga lai. Lisaaineid kasutatakse toidus ja jookides eelkõige toiduainete keemiliste ja füüsikaliste omaduste säilitamiseks ja parandamiseks. Suurem osa kasutatavatest lisaainetest on tööstuslikult toodetud. Seaduslikult kasutusel olevaid lisaaineid on põhjalikult uuritud ja nende päevased ohutud kogused on kindlaks määratud. Siiski on nii tarbijate kui ka teadlaste hulgas vastakaid arvamusi lisaainetega toitute ja jookide ohutuse suhtes.

Antud töös uuritavad ained on toiduainetööstuses laialt levinud. Aspartaam ja atsesulfaam-K kuuluvad palju kõneainet tekitanud tehislise magustajate hulka. Bensoehape ja selle soolad on kasutusel säilitusainetena ja nii võib vaadelda ka C-vitamiinina tuntud antioksüdanti askorbiinhapet. Erkpuvane 4R, patentsinine ja tartrasiin on aso-toiduvärvid.

Toidualaseid uurimisi teostavad institutsioonid on ühel meelel, et toidu lisaained, kaasaarvatud ülalmainitud, on suurtes kogustes tervisele ohtlikud. Erimeelsused seisnevad selles, et leidub osapooli, kes ei ole kindlad hetkel lubatud koguste tervislikkuses. Tarbija jaoks jäävad lisaainete kogused aga tihti teadmata, sest toodetel ei ole enamasti märgitud selles sisalduvate lisaainete kontsentratsioon. On ka esinenud juhtumeid, kus toote kontrollimisel on lisaaine sisaldus märkimisväärselt erinenud tootjapoolsest infost. Sellepärast on kasvav vajadus toidu lisaainete kiireks ja mugavaks identifitseerimiseks toiduainetes.

Uurimistöö eesmärk on välja töötada kiire, usaldusväärne ja keskkonnasäästlik meetod ülaltoodud lisaainete samaaegseks kvantitatiivseks analüüsiks erinevates jookides.

Uurimistöö hüpotees on, et kapillaartsoonelektroforeetiline meetod on piisavalt kiire ja usaldusväärne toidu lisaainete (sealhulgas ebastabiilsete ainete) analüüsiks jookides ja on täiendavaks meetodiks klassikaliste analüüsimeetodite kõrval.

Kapillaartsoonelektroforees on üks tänapäeval kiiresti populaarseks saanud analüütilistest lahutusmeetoditest, mida iseloomustavad väga hea lahutuvusvõime ja lühikesed

analüüsiajad. Samuti on tegu keskkonnasäästliku meetodiga, kuna kasutatavad ainekogused (nii reagentide kui ka proovide osas) on väga väikesed. Viimasest asjaolust tuleneb nii reaktiivide väike kulu (suhteliselt madal analüüsi hind) ja tekkivate jääkide väike kogus.

Kapillaartsoonelektroforeesi lahutuspõhimõte seisneb laetud aineosakeste erineval liikumiskiirusel elektriväljas. Meetod on suhteliselt uus, mistõttu paljude objektide puhul ei ole olemas välja töötatud analüüsimeetodikaid. Autori andmetel ei ole antud töös uuritava probleemi lahendamiseks – tehislake magustajate, säilitusainete ja aso-toiduvärvide koostääramiseks – kapillaartsoonelektroforeetilist analüüsimeetodit välja töötatud.

Uurimistöö koosneb kolmest osast. Esimeses peatükis antakse kirjanduslik ülevaade iga uuritava aine kohta eraldi ning tutvustatakse lähemalt nii vedelikkromatograafiat kui ka kapillaartsoonelektroforeesi. Teises peatükis kirjeldatakse materjale ja katsemetodikaid. Kolmandas peatükis esitatakse tulemuste analüüs ja arutelu.

Töö autor tänab juhendajat professor Ruth Shimmot suure abi, väärtuslike nõuannete ja mõistva suhtumise eest. Suur tänu ka Riina Leisile Tervisehoiu Tartu laborist, kes oli lahkelt nõus vastama kõiksugustele küsimustele.

1. Kirjanduslik ülevaade

1.1. Toidu lisaained

Toidu lisaained on tänapäeva toiduainetööstuse lahutamatud osad. Neid leidub peaaegu kõikides valmistoodetes, on vaid üksikud tooted kaubalettidel, millesse ei ole lubatud lisada lisaaineid. Nendeks on näiteks mesi, kohv, tee ja piim. (Keemilised riskitegurid...: 2004).

Lisaainete kasutamine on alguse saanud värskete juurviljade ja puuviljade ning toore liha kuivatamisest, soolamisest ja marineerimisest. Tänapäeval on lisaainete lisamise kaks peamist eesmärki: esiteks muuta toit turvalisemaks ehk takistada mikroobide arengut ja oksüdatsiooniprotsessi ning muude keemiliste reaktsioone kulgemist, teiseks suurendada toidu atraktiivsust ja söömisnaudingut. (Emerton, Choi 2008: 3)

Toidu lisaaine on Euroopa Ühenduste Nõukogu direktiivis defineeritud kui „aine, mida olenemata tema toiteväärtusest ei kasutata iseseisva toiduainena või toiduainele iseloomuliku koostisainena ja mille tahtlik tehnoloogilisel eesmärgil lisamine toiduainele selle tootmisel, töötlemisel, valmistamisel, käitlemisel, pakendamisel, transpordil või ladustamisel viib või võib põhjendatud oletusel viia selleni, et lisaaine ise või tema kõrvalsaadused muutuvad otseselt või kaudselt selliste toiduainete koostisosaks¹.“

Lisaained toidus võib liigitada päritolu järgi loodulikeks, loodusidentseteks ja sünteetilisteks (Keemilised riskitegurid...: 2004). Just viimaste kasutamine tekitab nii tavatarbijates kui ka teadlastes vastakaid arvamusi. Viiakse läbi palju uuringuid, et kehtestada piirkogused lisaainete kasutamiseks, püütakse välja selgitada, kas lisaainet on vaja, kas see on ohutu, kui jah, siis millises koguses. Lubatud lisaainetele antakse Euroopa piires E-number. Igale ainele määratakse ka ADI (*Acceptable Daily Intake*) ehk ohutu totaalkogus lisaainet keha kilogrammi kohta, mida võib tarbida igapäevaselt terve elu

¹ Euroopa Ühenduste Nõukogu direktiiv 89/107/EMÜ

omamata kahjustavat mõju tervisele. (Dunn 1997: 187). Antud töös analüüsitud lisaainete ADI kogused ja E-numbrid on toodud lisas 3.

Tabel 1. Lisaainete rühmadele vastavad E-numbrid.

Toiduvärvid	E 100- E199
Konservandid	E200- E 299
Antioksidandid	E300- E 399
Emulgaatorid, stabilisaatorid, paksendajad	E400- E 499
Mitmesugused muud lisaained	E500- ...

Allikas: Keemilised riskitegurid...: 2004

1.1.1. Säilitusained

Säilitusained ehk konservandid on arvatavasti kõige tähtsam toidulisainete klass, sest nad mängivad suurt rolli toiduainete tarbimise ohutuses. Tänu säilitusainete baktereid hävitavatele omadustele on säilivusaja jooksul toidud vabad toksiinidest ja ei põhjusta toidumürgitusi. (Emerton, Choi 2008: 6). Sünteetilised säilitusained on laialdaselt kasutusel tänu oma töökindlusele, odavusele ja laiale kättesaadavusele. Tänu sellele on orgaanilised happed nagu näiteks bensoehape, sorbiinhape, dokosaheksaeenhape ja parabeenid tavalised, mida kasutatakse toiduainete säilivusaja pikendamiseks. (Li et al. 2007: 165)

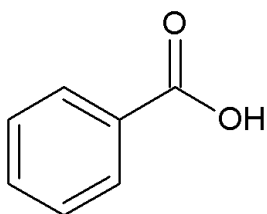
Paljud uurimused on tõestanud, et ulatuslik sünteetiliste säilitusainete kasutamine võib viia terviseriketeneni. Näiteks on parabeenide kahjulikkus ja nende seni aktsepteeritud kogused täiendavate uurimiste käigus seatud kahtluse alla, on selgunud, et nad mõjutavad testosterooni taset veres ja valede koguste tarbimisel võivad tekitada häireid inimkehas. (Ibid.: 166)

Ka antioksidante võib liigitada säilitusainete hulka, sest tänu oksüdatiivsete protsesside aeglustamisele pikendavad nad toodete säilivusaega. Mõned antioksidandid eemaldavad hapniku keskkonnast ise oksüdeerudes, näiteks askorbiinhape, mõned aga sekkuvad

oksideerumisprotsessi. Antioksidantide kasutamine aitab ära hoida toidu riknemise, värvimuutused ja toiteväärtuse vähenemise.(Emerton, Choi 2008: 6)

1.1.1.1. Bensoaadid

Bensoaate e bensoehappe soolasid kasutatakse toiduainetööstuses alates 20. saj algusest säilitusainetena pärmseene ja hallituse vastu. Vähem efektiivsemad on nad võitluses bakteritega. Kasutusel on bensoehape ja selle soolad naatrium-, kaalium- ja kaltsiumbensoaat, vastavalt E210-E213. (Emerton, Choi 2008: 136) Bensoehapet leidub looduslikult väheste kogustena paljudes toiduainetes. Puuviljades, eriti aga jõhvikates ja ploomides on seda kõige rohkem. Toidutööstuses kasutatav bensoehape on toodetud siiski sünteetiliselt. (Coultate 2009: 370-371)



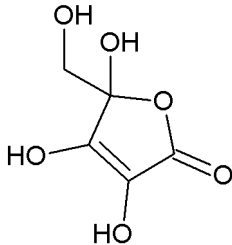
Joonis 1. Bensoehappe struktuur.

1990ndatel ilmneseid kahtlused bensoaatide ohutusest. Leiti, et nende lisamine teatud jookidele põhjustab benseeni teket, mis on aga tuntud kantserogeenne aine. Põhiliselt on benseeni leitud koolajookidest (umbes 38 nanogrammi liitri kohta). Tänapäevaks on kindlaks tehtud benseeni tekkimise põhjus. Karastusjookid on üldjuhul happelised, sellises keskkonnas askorbiinhappe, teatud metalliioonide ja hapniku vahelise reaktsiooni saadus reageerib bensoehappega ja tulemusena tekib benseen. (Ibid.: 371-372)

Bensoehape on aktiivses olekus vaid happelises keskkonnas (pH 2,5-4,0), sellest tingituna on tema kasutusvaldkond säilitusainena piiratud. (Ibid.: 371) Toiduainetööstuses kasutatakse bensoaate eelkõige karastusjookides. Bensoehape on hüdrofoobne aine, sellepärast kasutatakse toidulisainetena enim tema vees lahustuvat soola naatriumbensoaati. Kaaliumbensoaat on kasutusel toitides, kus naatriumi sisaldus on piiratud. (Emerton, Choi 2008: 137) Bensoaatide kasutamise kontsentratsiooni piirab nende omapärane maitse. Pärmseene vastase toime tõttu ei saa neid lisada toodetele, mille valmistamisel on kasutatud kergitusaineid. (Ibid.: 137)

1.1.1.2. Askorbiinhape

Askorbiinhape (E300) e vitamiin C on antiskorbuutne vesilahustuv ühend. Oma redutseerivate omaduste tõttu kasutatakse teda antioksüdandina. Selle üsna tugeva happe bioaktiivsus kaob kuumutamisel, hapniku ja valguse toimetel. (Zilmer et al. 2006: 182)



Joonis 2. Askorbiinhappe struktuur.

Askorbiinhapet on vaja naha, igemete, kapillaaride, hammaste, sidemete ja luude normaalseks funktsioneerimiseks (Ibid.: 182). Väga oluline on ka selle roll sidekoe proteiini kollageeni moodustamisel (Coultate 2009: 334). Tervislikke eluviise järgides askorbiinhappe defitsiiti tavaliselt ei teki. Kergesti võib puudus tekkida aga alkohoolikutel, suitsetajatel ja antibiootikumide tarvitamisel. Tõsise defitsiidi tagajärjeks on skorbuut, mille mõned kaebustest on kapillaaride katkemised, hammaste väljalangemine, kergesti murduvad luud ja kõhulahtisus. Askorbiinhappe ööpäevase soovitatava koguse ületamine põhjustab omakorda seedetalituse häireid, neerukivide teket, kuumalaineid, väsimust ja iiveldust. (Zilmer et al. 2006: 183-184)

Askorbiinhapet leidub laialdaselt taimekoos ja peaaegu kõik imetajad suudavad seda ise sünteesida. Inimesele, kellel see võime puudub, on peamisteks allikateks enamik juur- ja puuviljadest. (Coultate 2009: 332-333) Askorbiinhape on üks ebastabiilsemaid vitamiine. Kaod esinevad nii töötlemisel, toiduvalmistamisel kui ka säilitamisel. (Ibid.: 336) Enamus tööstuses kasutatavast askorbiinhapest on kunstlikult toodetud glükoosist (Emerton, Choi 2008: 157). Toidukeemias kasutatakse seda lisaainet eelkõige kui tugevat antioksüdanti. Konserveeritud puu- ja juurviljades kasutatakse seda takistamaks värvimuutuseid ning lihatoodetes värviomaduste parandamiseks. Samuti lisatakse askorbiinhapet toiduainetele kui spetsiaalset toitainet. (Emerton, Choi 2008: 157) Askorbiinhape on hinnatud toidulisaine tänu oma odavusele ja sobilikkusele toitaineks pigem majanduslikel kui toiteväärtuslikel põhjustel (Coultate 2009: 337).

Askorbiinhape on toiduainetööstuses väga ulatuslikult kasutusel. Seda lisatakse näiteks leivale ja konserveeritud puu- ja juurviljadele. (Emerton, Choi 2008: 157) Tänu suuremale stabiilsusele happelises keskkonnas kasutatakse seda laialdasel ka puuviljajookides (Coultate 2009: 337).

1.1.2. Toiduvärvid

Toiduvärve kasutatakse toidu välimuse parandamiseks. Toiduained võivad kaotada oma loomuliku värvi töötlemise käigus, mis kahjustab nende kaubanduslikku atraktiivsust. Toiduvärve lisatakse ka toodete dekoreerimiseks. Nende kasutamist võib pidada omamoodi tarbija peibutamiseks, sest maskeeritakse toote loomulik värv. (Emerton, Choi 2008: 7-8)

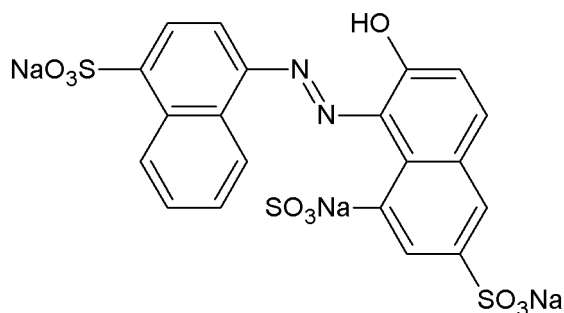
Toiduvärve võib lugeda kõige ohtlikumate lisaainete hulka, sest nad võivad osutada allergeenideks (Keemilised riskitegurid...:2004). Toidu lisaainete uuringutes keskendutakse kantserogeensete ainete ja koguste määramisele ja vähem pööratakse tähelepanu võimalikule füüsilisele talumatusele ja allergiatele. Teaduslikud uuringud on välja selgitanud, et osad sünteetilistest toiduvärvidest on eriti kahjulikud vastuvõtlikele lastele põhjustades hüperaktiivsust ja keskendumishäireid. (Coultate 2009: 250-251) Tihti on erksavärvilised tooted mõeldud aga just laste tähelepanu äratamiseks (Emerton, Choi 2008: 8)

Loodusliku päritoluga toiduvärve nagu karotenoidid ja karamellid on inimesed kasutanud pikka aega. Moodsas toiduainetööstuses eelistatakse aga sünteetilisi toiduvärve, sest need on tihti erksamad, stabiilsemad, odavamad ja neid leidub paljudes toonides. (Coultate 2009: 244-245)

Sünteetilised toiduvärvidest enim tuntud on asovärvid, mis on saanud oma nime aso rühma järgi (-N=N-). Nende hulka kuuluvad ka tartrasiin ja erkpunane 4R. (Ibid.: 245-246)

1.1.2.1. Erkpunane 4R

Erkpunane 4R (E124) on sünteetiline asovärv, mida lisatakse toidule, et saavutada erkpunane värvus. Toiduainetööstuses on see kasutusel naatriumi soolana. Sageli kasutatakse seda maasika,- kirsi- ja punase sõstra maitselistes toitutes. (Emerton, Choi 2008: 108) Värv on vees hästi lahustuv, vastupidav valgusele, kuumusele ja puuviljahapetele. Ebastabiilsus ilmneb C-vitamiini juuresolekul. (Ponceau 4R)

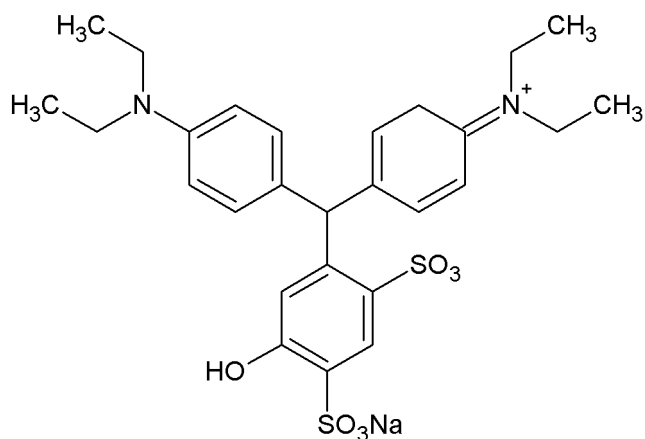


Joonis 3. Erkpunane 4R naatriumi soola struktuur.

Erkpunane 4R-i võib toiduvärvina leida mitmesugustest karastusjookidest, jäätistest, kondiitritoodetest, maiustustest ja juustudest (Emerton, Choi 2008: 109).

1.1.2.2. Patentsinine V

Patentsinine V (E131) on sünteetiline triarüülmetaanide klassi kuuluv happeline toiduvärv (Coultate 2009: 246). Enamasti kasutatakse patentsinine V naatriumi või kaltsiumi soola koos tartrasiini või kinoliinkollasega, et saavutada roheline värvus (Emerton, Choi 2008: 111). Laialdast kasutust on leidnud värvaine ka tekstiili- ja kosmeetikatööstuses. Patentsinine V on vees hästi lahustuv ja kuumusekindel. (Patent Blue V) Vähem vastupidav on värv puuviljahapetele ja bensoehappele (Emerton, Choi 2008: 111)

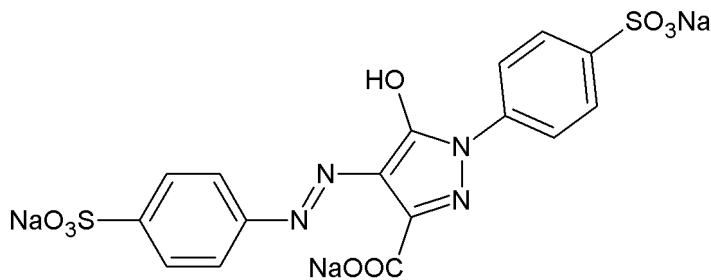


Joonis 4. Patentsinine V naatriumi soola struktuur.

Toiduvärvina on kasutusel küpsetistes ja kondiitritoodetes (Ibid.: 111)

1.1.2.3. Tartrasiin

Tartrasiin (E102) on sünteetiline asovärv, mida lisatakse toidule, et saavutada sidrunikollane värvus. Toiduainetööstuses on see värvaine kasutusel naatriumi soolana. Tartrasiini peetakse kõige kahjulikumaks toiduvärviks. On tõendeid, et 0,01% - 0,1% inimestest on selle värvi vastu tundlikud (Coultate 2009: 250). Sageli kasutatakse seda sidruni- ja laimimaitseelistes toitudes. (Emerton, Choi 2008: 103) Sarnaselt erkpunane 4R-ga on tartasiin vees hästi lahustuv, stabiilne valguses, kuumuses, puuviljahapetes ja ebastabiilne C-vitamiiniga kokkupuutes (Tartrazine).



Joonis 5. Tartrasiini naatriumisoola struktuur.

Tartrasiini lisatakse mitmesugustele karastusjookidele, jäätistele, magustoitule, kondiitritoodele, marineeritud toodetele, kastmetele ja maitseainetele (Emerton, Choi 2008: 103)

1.1.3. Tehislikud magustajad

Tehislikud magustajad on orgaanilised ühendid, mis moodustavad tähtsa grupi toidulisanditest. Neid kasutatakse toiduaine- ja farmaatsiatööstuses, sest annavad toodetele magusa maitse, omades seejuures minimaalset toiteväärtust.

Tehislike magustajate kasutamine toiduainetes on laialt levinud ja laieneb pidevalt. Selle peamised põhjused on majanduslikud. Asendades suhkrupeedist ja -roost valmistatud loodusliku suhkru kunstlike magusainetega on võimalik vähendada toomiskulusid.

Tehislikud magustajad kuuluvad enim vaidlust tekitanud toidulisandite hulka, kahtlustatakse nende negatiivset mõju tervisele. Süüdistuste hulka kuuluvad väited, et suhkruasendajad võivad põhjustada dermatoloogilisi probleeme, peavalusid, tujukõikumisi, käitumishäireid, hingamisraskusi, atakke, allergiaid ja vähki. Toidutöösturid kipuvad aga esile tooma vaid eelnimetatud ainete positiivseid omadusi: tehislikud magustajad on

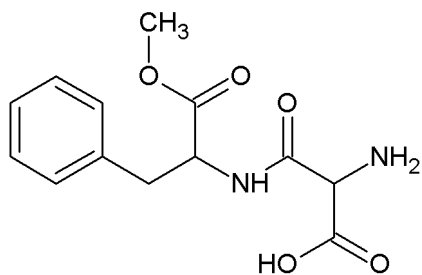
hambasõbralikud, võimaldavad diabeetikutel nautida magusat maitset ja piirata kaloritarbimist.

Tänapäeval teatakse väga paljusid suhkruasendajaid, kuid väheste kasutamine on lubatud kaasaegses toidutööstuses. Lubatud ained erinevad riigiti. Euroopa Liidus on nendeks kuus tehislikku magustajat (atsesulfaam-K- E950, aspartaam- E951, tsüklamiinhape ning selle soolad- E952, sahhariin- E954, sukraloos- E955, neohesperidiin DC -E959).

Nimetatud magusaineid lisatakse toodetele eraldi või segudena. Üha sagedasemad on mitmest magustajast koosnevad ained. Sellisel viisil on võimalik peita üksikuna esineva aine ebameeldivat kõrval- või järelmaitset. Segudel on täheldatud ka suuremat magususe astet kui selle komponentide magususte algebralisel summal. (Zygler et al. 2009)

1.1.3.1. Aspartaam

Aspartaam (E951) on valge, lõhnatu, kristalne pulber (Zygler et al. 2009). Selle tehniliku magustaja maitse on sarnane hariliku suhkru, sahharoosi, maitsega, kuid on 180 korda magusam. Aspartaami kalorsus on sarnaselt sahharoosi omaga 4 kcal/g. Tänu oma suurele magususele on kasutatavad kogused piisavalt väikesed, et aspartaami liigitada mitte toiteväärtust omavate ainete hulka. (Stoker 2004: 530) Kõrgetel temperatuuridel ja pH väärtustel alla 3 muutub aspartaam ebastabiilseks. Seetõttu ei kasutata seda ainet küpsetistes. (Zygler et al. 2009)



Joonis 6. Aspartaami struktuur.

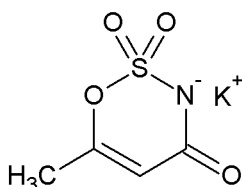
Aspartaam on arvatavasti turul olevatest tehnilikest magustajatest enim vaidlusi tekitanud. Oletatavate aspartaami poolt põhjustatud meditsiiniliste kaebuste hulka kuuluvad ajukasvajad, mitmesugused skleroosid, luupus ja metanooli mürgitus. Viimane põhjustab omakorda nägemiskahjustusi, spasme, äkkvalusid, atakke, peavalusid, rahutust, mälukaotust, sünnidefekte, leukeemiat ja surma. (Ibid.)

Aspartaam avastati juhuslikult 1965. aastal keemiku James Schlattereri poolt, kes töötas firmas G.D Searle Company. Avastus tehti katsetades maohaavandi vastast ravimit. (Gold) Alates sellest ajast on aspartaami ulatuslikult uuritud.

Aspartaam on valmistatud kolmest ainek: asparagiinhappest, fenüülalaniinist ja metanoolist. Protsentuaalselt vastavalt 40%, 50%, 10%. Kahtlusi on äratanud kõik kolm ainet. (Ibid.) Aspartaami mürgisust käsitlevate uuringute tulemused on olnud vastuolulised. Ühiselt on välja toodud fenüülalaniini kahjulikkus inimestele, kes põevad fenüülketonuuriat. Seda haigust põdevatel inimestel võib aspartaami üleliigne tarbimine viia ajukahjustusteni. (Zygler et al. 2009)

1.1.3.2. Atsesulfaam K

Atsesulfaam K (E950) e atsesulfaamkaalium kuulub koos aspartaamiga kõige tavalisemate tehislike magustajate hulka, mis on lubatud umbes 90 riigis (Chen, Wang 2001: 57). Erinevalt aspartaamist on atsesulfaamkaalium veidi magusama maitsega ja talub hästi kõrgemaid temperatuure, seega on sobilik kasutamiseks kondiitritoodetes. Kõrgetes kontsentratsioonides on sellel magustajal mõru järelmaitse, kuid lahustuvus vees on väga hea, vastupidiselt enamikele sünteetilistele magustajatele. (Zygler et al. 2009)



Joonis 7. Atsesulfaam K struktuur.

Atsesulfaam K ei osale keha ainevahetuses ja väljub sellest algsel kujul. Seega ei oma ta toiteväärtust ja on „kalorivaba.“ Atsesulfaam K eeliseks on puhas magus maitse. Tihti segatakse seda aspartaamiga, et saavutada sahharoosile sarnane maitse. (Emerton, Choi 2008: 290)

Atsesulfaamkaalium on FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) poolt tootmisesse lubatud alates 1988. Aastast (Department of...: 2003). Seega on tegemist suhteliselt uue magustajaga lisaainete turul ja kõrvalmõjude adekvaatseks loeteluks pole sooritatud piisavalt uuringuid.

Atsesulfaam K-d kasutatakse magustajana jookides, jogurtites, piimatoodetes, magustoitudes, kondiitritoodetes, närimiskummides, ravimites ja suhkruasendajates (Emerton, Choi 2008: 290)

1.2. Kasutatavad analüüsimeetodid

1.2.1. Vedelikkromatograafia

Vedelikkromatograafia (HPLC) on lahutusmeetod, kus ainete lahutamine toimub nende mingi ühise omaduse alusel. Selleks võib olla laengutihedus, osakese läbimõõt, hüdrofoobsus, teatud sidemete moodustamise võime jm. Segus, mille osakesi tahetakse lahutada, peab ainetel olema ühine omadus, aga erineval määral (näiteks kõik lahutatavad osakesed on mingil määral hüdrofoobsed kuid ühed on rohkem ja teised vähem hüdrofoobsed). Lahutusprotsess toimub kuni 5 mm sisediameetriga kolonnides, millesse on asetatud tahke faas e. statsionaarne faas. Torudest liigub läbi eluent e. liikuv faas. Ained lahutuvad, sest jaotuvad erinevalt statsionaarse ja liikuva faasi vahel. Aineosakesed on pikema või lühema aja jooksul kontaktis tahke faasiga. See protsess toimub palju kordi terve kolonni ulatuses ja eduka katse lõpus tuvastatakse lahutunud ained detektoriga. (Skoog 1998: 675-680)

Laialt on levinud ainete vedelikkromatograafiline lahutamine nende hüdrofoobsuste erinevuse alusel, selliselt lahutatakse üldjuhul neutraalseid aineid. Kasutatakse nn pööratud faasi kolonne, kus valitakse hüdrofoobne statsionaarne faas ja hüdrofiilne eluent, mis on enamasti segu vesilahusest ja polaarsetest solvendist (atsetonitriil või metanool). Pööratud faasi kromatograafia sobib hüdrofiilsete ja mõõdukalt hüdrofoobsete ainete lahutamiseks, mis lahustuvad hästi kasutatavates polaarsetes eluentides. Pööratud faasi kromatograafia on kasutusel ka antud töö uurimisobjektide puhul, mis kõik lahustuvad vees suuremal või vähemal määral (Leis 2009).

Vedelikkromatograafia alaseid meetodeid, kus uuritakse tehislikke magustajaid kirjeldab Zygler et al. artiklis „*Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs*,“ jookides sisalduvate sünteetiliste säilitusainete HPLC alast analüüsi aga Li et al. artiklis „*Accurate screening for synthetic preservatives in beverages using high performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry*“ (Zygler et al. 2009, Li et al. 2008). Neljakümme sünteetilist toiduvärvi on edukalt analüüsitud HPLC meetodit kasutades Yoshioka, Ichihashi artiklis „*Determination of 40 synthetic food colors*

in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection“ (Yoshioka, Ichihashi 2008). Garcia-Jimenez et al. artikkel käsitleb antioksidantide, säilitusainete ja magustajate samaaegset analüüsi vedelikkromatograafilisel meetodil artiklis „*Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column*” (Garcia-Jimenez 2007). Nimetatud töös uuritud ainetest kattus antud töö uurimisobjektidega aspartaam ja atsesulfaam K.

Vedelikkromatograafilist meetodit kasutatakse ka antud töös uuritud lisaainete rutiinseks analüüsiks Terviseameti Tartu laboris, kuigi seal ei analüüsita uuritavaid toidulisaineid samaaegselt vaid sooritatakse prooviga mitmekordne analüüs vastavalt tunnustatud meetoditele. Need on välja töötatud tavaliselt ühe või kahe lisaaine samaaegseks määramiseks proovis. (Leis 2009)

1.2.2. Kapillaarelektroforees

Kapillaarelektroforees (CE) on üks tänapäeval kiiresti populaarseks saanud lahutusmeetoditest. See on väga efektiivne analüütiline meetod segude lahutamiseks, mis võimaldab head lahutuvust ja lühikesi analüüsiaegu. (Kuo, Hsieh 1997: 334) Samuti on CE keskkonnasõbralik, sest kasutatavad ainekogused on minimaalsed. Seega on kemikaalide kulu väikene ja tekib vähe jääke.

CE on sündinud klassikalisest elektroforeesist ja kromatograafiast. Viimasest on võetud instrumendid ja automaatika, elektroforeesist aga lahutusmeetodi põhimõte. (Heiger 2000: 6)

Elektroforeesi leiutajaks on rootsi teadlane A.W.K. Tiselius, kes tutvustas lahutusmeetodit üldsusele 1937. aastal ja pärjati oma avastuse eest Nobeli preemiaga aastal 1948. (Nobeli preemia kodulehekülg)

CE enim kasutust leidnud erimenetluseks on kapillaartsoonelektroforees (CZE), milles toimivad põhimõtted ja seaduspärad, kehtivad osaliselt ka teistes CE alaliikides. CZE puhul saab eraldada ainult neid osakesi, mis puhvril dissotsieeruvad. Teisteks enamlevinud CE alaliikideks on mitsellaarne elektrokineetiline kromatograafia (MEKC), kapillaargeelektroforees (CGE) ja isotahhforees ja isoelektriline fokuseerimine.

(Kaljurand, Kuldvee 1997) Antud töös viidi kõik katsed läbi kasutades kapillaartsoonelektroforeesi.

CE alaseid töid, kus on uuritud toidu lisaaineid, on mitmeid, kuid harva käsitletakse erinevaid toidu lisaainete rühmi koos. Tehislike magustajate erinevaid CE analüüse toitudes on kirjeldanud Zygler et al. artiklis „*Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs*“ ja aspartaami kapillaartsoonelektroforeetilist analüüsi Pesek ja Matyska artiklis „*Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis*“ (Zygler et al. 2009, Pesek, Matyska 1997). Säilitusainete analüüs CE meetodil on kirjeldatud Kuo ja Hsieh artiklis „*Determination of preservatives in food products by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis with multiwavelength detection*“ (Kuo, Hsieh 1997). Tehislike magustajate, säilitusainete ja toiduvärvide samaaegset MEKC analüüsi karastusjookides käsitleb Frazier et al. artikkel „*Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks*“ (Frazier et al. 2000). Nimetatud töös uuriti mitmeid antud töö uurimisobjektidega kattuvaid toidu lisaaineid, kuid ei analüüsitud askorbiinhapet, tartrasiini ja patentsinine V-d. Viidatud töös viidi analüüsid läbi pindaktiivse aine mitselle sisaldavas keskkonnas, mitte kapillaartsoonelektroforeesiga nagu käesolevas töös.

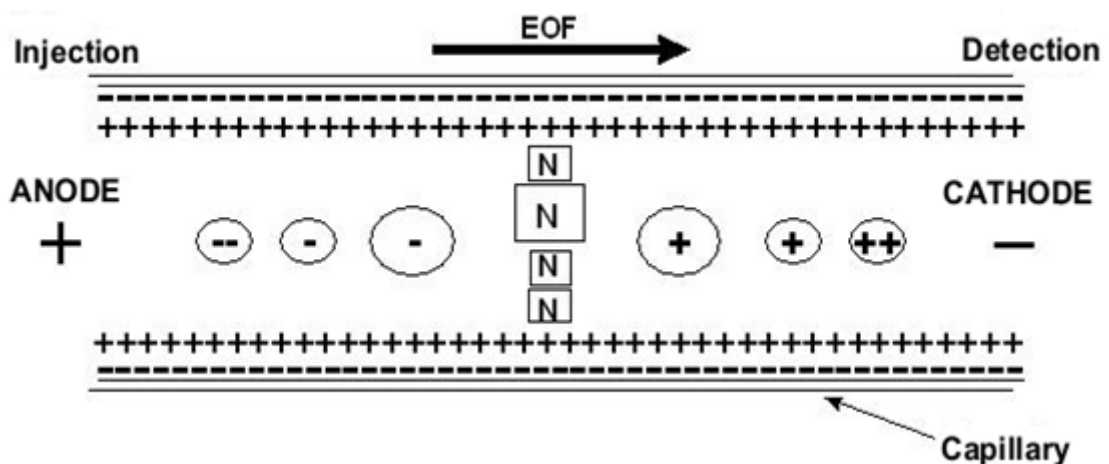
1.2.2.1. Kapillaartsoonelektroforeesi tööpõhimõte

Elektroforeesi defineeritakse kui laetud osakeste ehk ionide lahutamist elektrivälja mõjul (Heiger 2000: 16). Kapillaartsoonelektroforeesil toimub selline lahutamine elektrit juhtiva lahusega täidetud kapillaarkolonnis. Rakendades pinget lahusele, mis sisaldab ioone, hakkavad laetud osakesed liikuma. Negatiivsed ioonid (anioonid) liiguvad positiivse elektroodi (anoodi) poole ja positiivsed ioonid (katioonid) negatiivse elektroodi (katoodi) poole. Ioonide liikuvus sõltub mitmest tegurist, aga eeskätt nende raadiusest ja laengust. (Heiger 2000: 16) Ioonidel, millel on erinev laengu ja raadiuse suhe on elektriväljas ka erinev liikuvus. Liikuvuste erinevus võimaldab ioonidel lahutada individuaalsetele ainetele vastavateks tsoonideks. Lisaks sõltub liikuvus rakendatud elektrivälja tõmbejõust ja puhvri takistavast jõust. Mida suurem on iooni raadius ja mida suurem on puhvri viskoossus, seda suurem on takistav jõud ja seda aeglasemalt liigub laetud osake kapillaaris. (Kaljurand, Kuldvee 1997)

Kapillaartorus ei hakka pinge rakendamisel liikuma mitte ainult lahutatavad ioonid vaid kogu kapillaari täitev elektrolüüt. Elektrivälja toimetel kapillaaris tekkivat lahuse liikumist nimetatakse elektroosmootseks vooks (EOF).

EOF on keskse tähtsusega tegur kapillaartsoonelektroforeesis. See mõjutab ainete lahutuvust ja määrab aja, mille jooksul proov läbib kapillaari. Tihti on kapillaartorud valmistatud kvartsist, mille silanoolrühmad on võimelised dissotsieeruma ja ära andma H^+ -ioone. Selle protsessi tulemusena omandab kapillaari pind negatiivse laengu, mille suurus sõltub puhvri pH-st. Mida aluselisem on kapillaaris olev lahus, seda rohkem dissotsieeruvad silanoolrühmad, seda suurema negatiivse laengu kapillaari pind omandab ja seda suurem on üldjuhul ka EOF-i kiirus. Puhvris olevad solvateerunud prootonid kogunevad difuusse kihina kapillaari sisepinna lähedale. Rakendades pinget, hakkavad solvateerunud H^+ -ioonid liikuma negatiivse elektroodi - katoodi poole ja tõmbavad endaga kaasa kogu lahuse. Need ongi EOF-i liikumapanevaks jõuks.

EOF-i tähtsus kapillaartsoonelektroforeesi puhul seisneb peamiselt kahes asjaolus. Piisavaks lahutuvuseks on vaja, et ainetsoonid kapillaaris oleksid piisavalt kitsad. EOF-ist tingitud liikumine on lamedaprofiililine, s.t., et kõik punktid toru ristlõikes liiguvad ühesuguse kiirusega ja ei esine ainetsoonide laienemist. See võimaldab kapillaartsoonelektroforeetilise analüüsi käigus saada paremaid lahutusi, kui näiteks vedelikkromatograafias, kus vedelik liigub rõhu mõjul ja on seetõttu parabolse vooluprofiiliga.



Joonis 8. Erinevalt laetud osakeste liikumine kapillaaris.

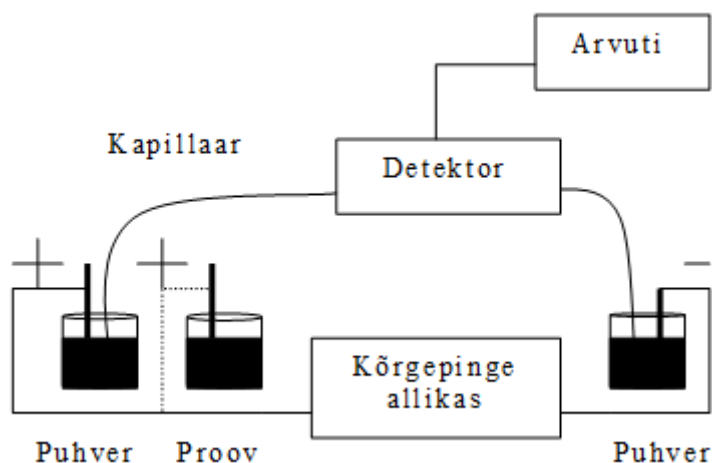
Allikas: The Swiss Laboratory for Doping Analyses koduleht

Teine põhjus, miks EOF etendab olulist rolli kapillaartsoonelektroforeesis on asjaolu, et EOF paneb kõiki laetud osakesi liikuma samas suunas. Joonisel 8 on kujutatud EOF-i liikumist katmata kapillaari korral, kus kõige kiiremini liiguvad suure positiivse laengu ja väikeste mõõtmatega katioonid, nende järel nõrgema laengu ja suuremate mõõtmatega positiivselt laetud osakesed. Keskel on kujutatud neutraalseid osakesi, mille EOF tõmbab endaga kaasa. Järgmistena jõuavad detektorini suured negatiivselt laetud osakesed ja kõige viimastena väikeste mõõtmatega ja tugevalt negatiivse laenguga anioonid, mille EOF viib endaga kaasa, sest tema kiirus on suurem, kui anioonide liikumiskiirus.

1.2.2.2. Kapillaartoru siseseina katmine

Kapillaari katmine on üks elektroforeesi erimenetlusi, mis elimineerib EOF-i või suunab selle ümber. Selle menetluse käigus kaetakse kapillaari sisesein polümeerse või pindaktiivse ainega. Olenemata EOF-i kasulikkusest võib see katseseeria käigus muutuda (kui proovis leidub aineid, mis adsorbeeruvad kapillaari seinale) ja osade katsete puhul olla segav. EOF-i elimineerimiseks kaetakse kapillaari sein neutraalse polümeerse ainega. EOF-i suuna muutmise pakub huvi selliste rakenduste puhul, kus lahutatavad ained on anioonsed ning nende katoodile jõudmine kestab isegi maksimaalse EOF-i kiiruse juures ebasoovitavalt kaua. EOF-i suunamiseks katoodilt anoodi poole seotakse katioonne pindaktiivne aine (või polümeer) kapillaari seina külge, kus see haakub hüdroksüülrühmadega. Tänu sellele saab kapillaari sein positiivse laengu. (Kaljurand, Kuldvee 1997:) Proov sisestatakse sel juhul katoodi juures ja lahus liigub negatiivselt elektrodilt (katoodilt) positiivse elektroodi (anoodi) poole.

1.2.2.3. Kapillaartsoonelektroforeesi seade



Joonis 9. Kapillaartsoonelektroforeesi seade.

Joonisel 9 kujutatud kapillaartsoonelektroforeesi seade on ehituselt lihtne. Katse käigus on kapillaari mõlemad otsad puhvritega täidetud plastikviaalides, proovi sisestamise ajaks asetatakse anoodi poolne ots prooviga täidetud viaali. Detektoriteks on lihtsamatel instrumentidel UV- või fluorestsentsdetektor, detektoriraku moodustab kapillaari osa, kust väliskülge kattev polüamiidikiht on ära põletatud. Kõrgepingeallika elektroodid on koos kapillaari otstega puhvriviaalides. Tulemused kuvatakse arvuti ekraanil (Kaljurand, Kuldvee 1997).

1.2.3. Analüüsimeetodite võrdlus

Nii CE kui ka HPLC puhul on teoreetiliselt võimalik antud toidu lisaaineid samaaegselt analüüsida. Vedelikkromatograafia usaldusväärsust tõstab tema vanus. HPLC on ammu kasutusel olev analüüsimeetod ja rutiinsel tasemel välja töötatud kromatograafilisi meetodeid on palju rohkem kui kapillaartsoonelektroforeesi valdkonnas. Vedelikkromatograafia puhul on kolonnide mõõtmed suuremad, seega ka detekteerimispiirid madalamad, mis tähendab, et ilma proovi komponente modifitseerimata on võimalik analüüsida lahjemaid proove kui CE meetodi puhul. CE puhul on nimetatud puudused ületatavad, kuid vajavad sageli lisaprotseduure.

Teiselt poolt omab kapillaarelektroforees vedelikkromatograafia ees ka mitmeid eeliseid. Kapillaarelektroforees on suure lahutusvõimega analüüsimeetod, kus optimeeritud analüüsi puhul on võimalik saavutada ainete väga efektiivne lahutamine lühikese aja jooksul. Samuti on CE märksa materjalisäästlikum ja keskkonnasõbralikum

analüüsimeetod. Kasutatavad lahused on tavaliselt lahjad vesilahused, orgaanilisi lahusteid kasutatakse väga harva. Reagentide ja proovi kulu ning ka jääkide teke on kümneid kordi väiksem kui vedelikkromatograafias. Reagentid sisestatakse 0,8 ml mahtuvusega viaalidesse, mida on võimalik kasutada 5-10 katse jooksul. HPLC-s kulub üheainsa paarikümneminutilise katse jooksul reeglina mitukümmend milliliitrit lahusteid. Ka on kvartskapillaarid, mida kapillaarelektroforeesis kasutatakse keskmiselt umbes sada korda madalama hinnaga kui vedelikkromatograafias kasutatavad kolonnid.

Hoolimata kapillaarelektroforeesi mitmetest eelistest ei peaks meetodit vaatlema kui võistlejat vedelikkromatograafilistele meetoditele, vaid pigem kui täiendavat meetodit. Seda eelkõige kuna meetodite lahutuspõhimõte on erinev, mistõttu tulemuse edukus sõltub palju ka analüüsiobjektist. Antud töös uuritakse kapillaartsoonelektroforeetilise meetodi kasutamise võimalusi toidu lisaainete analüüsil eesmärgiga töötada välja analüüsimeetod, mis ühelt poolt täiendaks juba olemasolevaid analüüsimeetodeid ning teiselt poolt võimaldaks tõsta toidu lisaainete analüüsi kiirust määrates korraga mitmeid erinevat tüüpi toidu lisaaineid.

2. Materjalid ja metoodikad

2.1. Reaktiivid ja võrdluspreparaadid

Katsete käigus uuriti erinevad jooke ja siirupina manustatavat ravimit:

1. Mahlajook 1, Eesti tootja 1. Realiseerimiskuupäev 12.03.2010, avatud 13.10.2009 kell 13.45, realiseerimiskuupäev 08.05.2010, avatud 06.01.2010 kell 12.00.
2. Limonaad 1, Eesti tootja 2. Realiseerimiskuupäev 31.05.2010, avatud 28.10.2009 kell 10.50, realiseerimiskuupäev 27.07.2010, avatud 06.01.2010 kell 10.15.
3. Spordijook, Eesti tootja 3. Realiseerimiskuupäev 13.02.2010, avatud 21.10.2009 kell 10.30.
4. Karastusjook, Eesti tootja 4. Realiseerimiskuupäev jaanuar 2010, avatud 13.10.2009, kell 13.40.
5. Ravim, Prantsusmaa tootja. Realiseerimiskuupäev oktoober 2013, avatud 28.10.2009 kell 9.00.

Kõik joogid osteti kohalikest kauplustest ja ravim kohalikust apteegist toodetele vastavatel avamiskuupäevadel.

Katsete tegemiseks olid vajalikud uuritavate lisaainete standardid ja muud reaktiivid: kollane toiduvärv, koostis: H_2O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, E102 (1,6%), punane toiduvärv, koostis: H_2O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, E124 (2,5%), roheline toiduvärv, koostis: H_2O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, E102 (1,5%), E131 (0,34%). (NordArom AB), bensoehape (Reakhim), askorbiinhape (Oriola), L-tsüsteiin (ICN Biomedicals Inc.), NaOH (Reakhim), ammooniumatsetaat (Reakhim), polümeerne aine PolyE-323 (saadud kingitusena professor Jonas Bergquistilt Uppsala Ülikoolist), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Standard), Na_2CO_3 (Reakhim) ja HCl (Lash-Ner). Atesulfaam K ja aspartaami kvalitatiivseks analüüsiks jookides kasutati suhkruasendaja Candarel (Merisant Company) tableti vesilahust. Kõikide lahuste valmistamisel kasutati bidestilleeritud vett (destilleeritud Tallinna Ülikooli laboris).

2.2. Aparatuur, tarkvara ja materjalid

Kapillaartsoonelektroforeesil kasutati katmata kvartskapillaare, mille sisediameeter oli 50 µm ja välisdiameeter 375 µm. Kapillaari pikkus detektorini oli 40 cm ja täispikkus 48,5 cm. Katsed sooritati täisautomatiseeritud Hewlett-Packard-i 3D kapillaartsoonelektroforeesi süsteemiga, mis oli varustatud diodrea detektoriga. Kõikide katsete korral oli detektori signaalide väärtuseks 200 ja 265 nm. Lisaks kasutati detekteerimiseks lainepikkuseid väärtustega 210, 245, 280, 425, 599 nm.

Katsete tulemusi analüüsiti kasutades ChemStation 32 tarkvara. Töös esitatud lisaainete struktuuride koostamisel on kasutatud ACD/ChemSketch 2.0 tarkvara.

Proovide ettevalmistamisel ja katsete sooritamisel kasutati analüütilisi kaale (Precisa XT 220A), pH meetrit (Mettler Toledo MP 225), ultrahelivanni (J.P. Selecta), filtreid, plastikviaale, katseklaase, klaaskolbe, klaaslehtreid ja süstlaid.

2.3. Metoodikad

2.3.1. Standardlahuste valmistamine

Lisaainete kontsentratsioonide määramiseks jookides ja ravimis valmistati teadaoleva kontsentratsiooniga standardlahused bidestilleeritud vette. Standardlahuseid ei saanud valmistada aspartaami ja atsesulfaam K kvantitatiivseks analüüsiks, sest puhtad standardained ei olnud kättesaadavad.

Erineva kontsentratsiooniga standardlahuseid valmistati standarditest mitmel korral ja üldjuhul korraga neli. (vt tabelit 2)

Tabel 2. Valmistatud standardlahuste kontsentratsioonid.

Toidu lisaaine	Valmistatud standardlahuste kontsentratsioonid (mg/l)
Bensoehape	30; 60; 130; 250; 1250
Askorbiinhape	60; 125; 250; 500; 1000; 2000; 10000
Erkpunane 4R	3; 9; 30; 80; 160; 300; 600
Patentsinine	0,7; 2,7; 3,4; 5,3; 8,5; 20; 34; 85; 170; 340; 680
Tartrasiin	3; 15; 40; 50; 100; 150; 200; 800; 1600; 3200

Askorbiinhappe lagunemise aeglustamiseks lisati ühel standardlahuste valmistamisel L-tüsteiini kontsentratsiooniga 400 mg/l.

2.3.2. Puhversüsteemide valmistamine

20 mM boraat- ja karbonaatpuhvri valmistamisel kasutati vastavaid soolasid ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ja Na_2CO_3). pH reguleeriti soovitud pH väärtuseni (9,5) 1 M HCl või 1 M NaOH lahuse abil. Puhversüsteemid valmistati vahetult enne analüüside läbiviimist ja enne masinasse panemist filtriti.

2.3.3. Kunstliku segu valmistamine

Demonstreerimaks CE sobivust kõigi töös uuritud toidu lisaainete üheaegseks lahutamiseks valmistati vesilahus, mis sisaldas kõiki uuritavaid toidu lisaaineid (ja sahhariini, mis oli esialgselt üks uuritavatest ainetest). Segu oli oluline indikaator katsete hindamisel ja meetodika optimeerimisel. Lõplik kunstlik segu valmistati vahetult enne analüüside läbiviimist.

2.3.4. Proovi ettevalmistus

Limonaad sonikeeriti enne masinasse panemist ultraheli vannis, et vabaneda gaasidest, mis võivad tekitada kapillaartorus voolukatkestuse. Mahlajook filtreeriti, et puhastada proov tahketest ainetest, mis võiksid kapillaari ummistada. Ravimist tehti katsete jaoks viiekordne lahjendus bidestilleeritud veega.

2.3.5. Kapillaartsoonelektroforeetiline analüüs

Uut kapillaari pesti 30 min 1M NaOH lahusega, bidestilleeritud veega ja tööpuhvriga.

Katseid sooritati nii katmata kapillaariga kui ka kaetud kapillaariga. Katsetingimused olid sellest sõltuvalt ka veidi erinevad.

Katsetingimused katmata kapillaariga olid järgmised:

- Proovi sisestusaeg oli 5 s.
- Rõhk proovi sisestamisel oli 50 mbar.
- Pinge suurus oli +20kV.

- Aineosakeste liikumine oli suunatud positiivselt elektroodilt (anoodilt) negatiivsele (katoodile).
- Voolutugevus oli ligikaudu 34 mikroamprit.

Nimetatud katsetingimused kehtivad kõigi töö käigus kirjeldatud katsete kohta, kui ei ole kirjutatud teisiti.

Polümeeriga kaetud kapillaariga sooritatud katsetes oli süsti ruumala sama, mis katmata kapillaariga, pinge suurus oli -20kV, aineosakeste liikumine oli suunatud katoodilt anoodile ja voolutugevus oli ligikaudu -33 kuni -31 mikroamprit.

2.3.5.1. Kapillaari katmine

Kapillaari katmise protseduur teostati vastavalt viitele Ullsten et al. 2004: 2090.

1. Kapillaari pesti 1M NaOH 30 min rõhul 950 mbar (aktiveeriti sisesein).
2. Kapillaari pesti deioniseeritud veega 5 min.
3. Kapillaar kaeti plümeeriga PolyE-323 (pH 7) 10 min jooksul.
4. Liigne polümeer pesti kapillaarist välja kasutades 50 mM ammooniumatsetaat puhvrit (pH 5) 5 min jooksul.

2.3.6. Lisaainete identifitseerimine

Kõige usaldusväärsem identifitseerimise viis on rikastamiskatse (standardi lisamine). Selle käigus lisatakse proovile ainet, mida soovitakse selles tuvastada. Võrreldakse puhta proovi ferogrammi pärast standardi lisamist saadud ferogrammiga. Kui üks piikidest on kasvanud (suurenenud pindala), siis võib väita, et antud aine piik proovis on identifitseeritud. Antud töös kasutati täiendavalt lainepikkuse võrdlust ainete puhul, mille neeldumismaksimumid asusid teadaolevalt kõrgemate (spetsiifiliste) lainepikkuste juures. Nii näiteks oli askorbiinhappe neeldumismaksimum 265 nm juures, samal ajal kui enamusel proovi komponentidel oli nimetatud lainepikkusel väga väike neelduvus. Kõrged lainepikkused (425 nm ja 599 nm) olid spetsiifilised sünteetilistele värvidele. Kollase värvi täiendavaks identifitseerimiseks kasutati lainepikkust 425 nm ja sinise jaoks 599 nm. (Coultate 2009: 248) Lisaks kasutati ka jookides ja ravimis sisalduvate lisaainete migratsiooniaegade võrdlemist standardlahustega sooritatud katsete migratsiooniaegadega.

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Puhversüsteemi valik

Kapillaartsoonelektroforeetilisel analüüsil on kapillaar täidetud puhvri vesilahusega, milles liiguvad uuritavate ainete osakesed. Puhvri pH mõjutab selles liikuvate ainete dissotsiatsiooni ja läbi selle osakeste laengut. Üks hapetele omistatav parameeter on ka pK_a väärtus. Sõltuvalt ainete dissotsiatsioonikonstantidest (pK_a) tingib puhversüsteemi keskkond, kas aine on neutraalne või laetud. Sama aine erinevalt laetud osakesed liiguvad kapillaaris aga erineva kiirusega ja niimoodi on võimalik katsetulemusi muuta. Puhvri pH mõjutab oluliselt ka kapillaari siseseina laengut, millest sõltub katseobjektide liikumiskiirus ja sellest tulenevalt migratsiooniajad. Puhversüsteemi valik on kapillaarelektroforeetilisel lahutusel määrava tähtsusega.

Katseobjektide dissotsiatsioonikonstandid (pK_a väärtused) on toodud lisa 3, kust on näha, et madalaim pK_a väärtus on askorbiinhappel (4,17), kõrgeima pK_a väärtusega on erkpunane 4R (11,2). Otsides optimaalseid katsetingimusi valiti pH väärtuseks 9,5, kus valdav enamus uuritavatest ainestest on loovutanud vesinikiooni ja on lahuses anioonsel kujul. Veelgi aluselise pH kasutuselevõtmist ei peetud otstarbekaks kuna pH 9,5 juures saavutati uuritavate ainete soovitud lahutuvus. Pealegi oleks boraatpuhvri aluselise suurendamisel vähenenud viimase puhvermahtuvus.

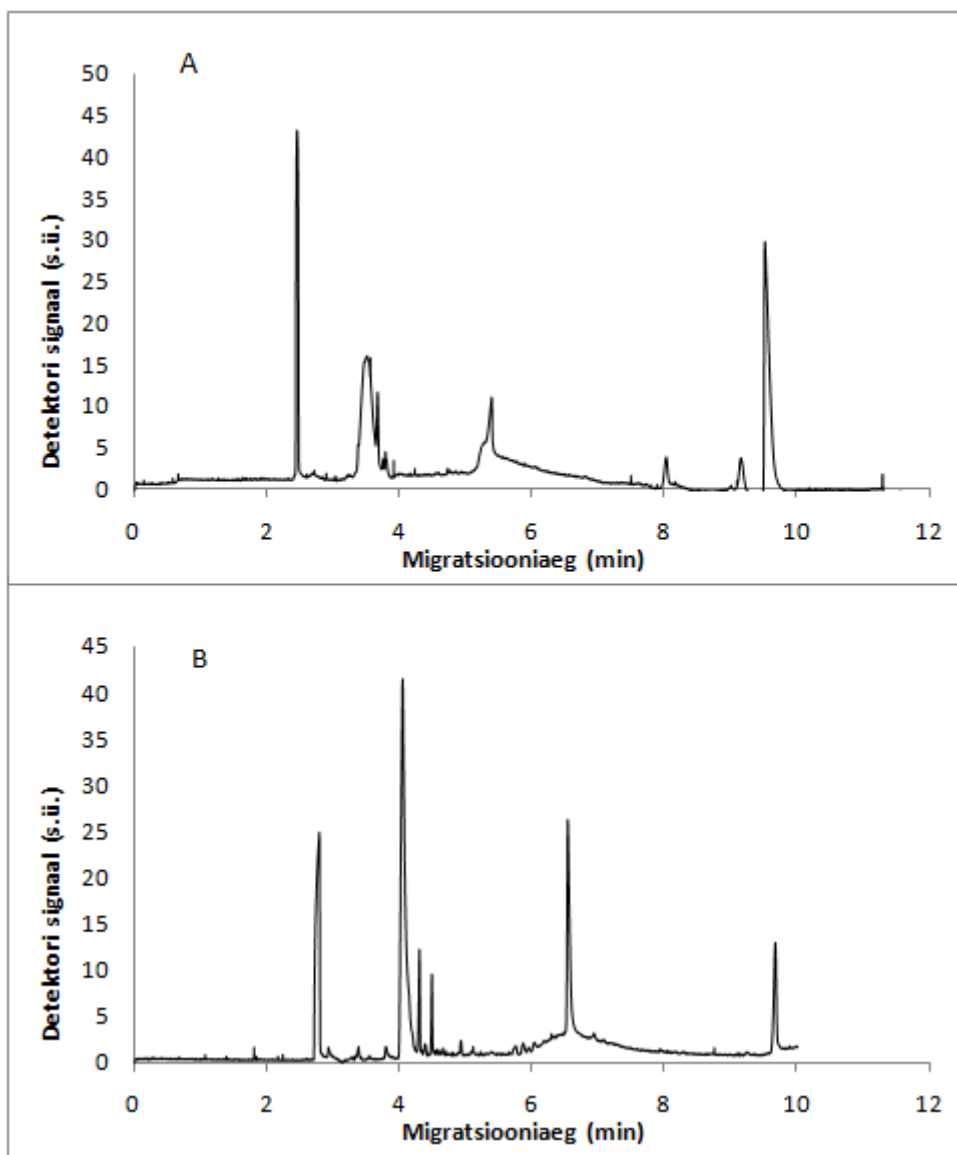
Tabelis 3 toodud andmete põhjal on näha, et lisaainete migreerumise järjekord põhinedes massi ja laengu suhtele ja tegelik väljumisjärjekord on erinevad. Põhjuseks on ilmselt asjaolu, et ka boraatioon võtab lahutamisprotsessist osa ja moodustab mõnede ainetega komplekse. Sellest sõltuvalt muutuvad ainete massid, laengud ja ka liikuvus kapillaaris.

Tabel 3. Lisaainete kapillaaris liikumise võrdlus

	Negatiivsete laengute arv pH 9,5 juures	Molaarmass	Järjekord põhinedes massi ja laengu suhtele	Tegelik järjekord
Bensoehape	1	122	7.	4.
Askorbiinhape	1	176	6.	3.
Erkpunane 4R	ligikaudu 0	604	1.	6.
Patentsinine	1	567	2.	2.
Tartrasiin	1	534	3.	7.
Aspartaam	1	294	4.	1.
Atsesulfaam K	1	201	5.	5.

Aluselise pH puhul on teada, et osad uuritud ainetest lagunevad sellises keskkonnas kiiremini. Samas on kapillaartsoonelektroforeetiline analüüs katmata kapillaaris palju kiirem just kõrgete pH väärtuste juures. Kiired analüüsi ajad kompenseerivad nt askorbiinhappe lagunemisprotsessi kiirust aluselises puhversüsteemis (Raudsepp 2009: 22). Lisaks saab kergesti lagunevate ainete stabiliseerimiseks lisada stabilisaatoritena mõjuvaid aineid. Ka kirjanduse andmetel on lisaainete kapillaartsoonelektroforeetilisel analüüsimetodil kasutatud peamiselt aluselisi puhvreid.

Töös uuriti kahe erineva puhversüsteemi, karbonaat- ja boraatpuhvri sobivust valitud lisaainete kapillaartsoonelektroforeetiliseks lahutamiseks. Boraat- ja karbonaatpuhvrite võrdlus teostati mitmete proovide – nii kunstlike segude kui ka analüüsitavaate jookide puhul. Katsed näitasid, et boraatpuhver tagas parema lahutuse lahutatavate ainete tsoonide vahel (vrd joonise 10 A ja B osa). Lahutuse paranemine avaldub eriti selgelt askorbiinhappe puhul, mis ainult boraatpuhvri kasutamisel lahutus tema kõrval elueeruvast ainst. Esines olukordi, kus karbonaatpuhvriga teostatud analüüsis olid kolm kõrvutiasetsevat ainepiiki nii halvasti lahutunud, et nende pindalade usaldusväärne mõõtmine ei olnud võimalik, kuid boraatpuhvri kasutamine võimaldas saada täielikult eraldiasetsevad ainepiigid. Joonisel 10 A osas on näha enne 4 minutit detekteeritud halvasti lahutunud ained, B osas on need samad ained kolme eraldiseisva piigina.



Joonis 10. Karastusjoogi elektroferogrammid. Kasutati (A) 20 mM karbonaatpuhvit, pH 9,5 (B) 20 mM boraatpuhvit, pH 9,5 ja 48,5 cm X 50 µm kvartskapillaari. Neelduvus mõõdeti lainepikkusel 200 nm.

Lisaks paranenud lahutusele on boraatpuhvriga läbi viidud katsete ferogrammidel stabiilsem nulljoon, mis võimaldab täpsemat kvantitatiivset analüüsi. Nulljoone erinevus tuleb eriti hästi välja võrreldes lisas 1 esitatud jooniseid 17 ja 18. Karbonaatpuhvri puhul kõigub nulljoon 10 suhtelise ühiku piires, mis muudaks katsetulemused mitteusaldusväärseks. Boraatpuhvrisüsteemi kasutades on ferogrammidel stabiilne nulljoon.

Standardlahustega läbi viidud katsetest võib öelda, et bensoehappe piik on boraadi korral kõrgem ja kitsam. Na₂CO₃ korral on see aga raskesti analüüsiv, piigi alumisest osast oli näha, et kõik ained ei ole lahutunud. Lisaks segab analüüsi taustamüra suurenemine. Sama

kehtib ka askorbiinhappe puhul, mille ferogrammidele oli näha vähem segavaid piike ja C-vitamiini piik oli kitsam ja kõrgem. Karbonaatpuhverüsteemi kasutades ei lahutu sünteetiline toiduvärv erkpunane 4R täielikult ja ferogrammilt oli näha väga suur piik, millest boraadi puhul eraldub punase piik. Ka rohelise standardiga läbi viidud katsetes oli nii tartrasiini kui ka patentsinise lahutuvus parem ja ferogrammide üldpilt vähem mürane.

Kirjanduse andmetel on toidu lisaainete analüüsil saadud häid tulemusi ka karbonaatpuhvriga, kuid seda vaid juhul kui puhversüsteemile on lisatud pindaktiivset ainet (Frazier et al. 2000: 215). Antud töös välditi pindaktiivse aine kasutuselevõtmist, kuna viimane muudab analüüsikeskkonna keerulisemaks, analüüsiajad pikemaks ja võib olla segav tegur meetodi ühendamisel teiste analüüsimeetoditega (nt massispektromeetriga).

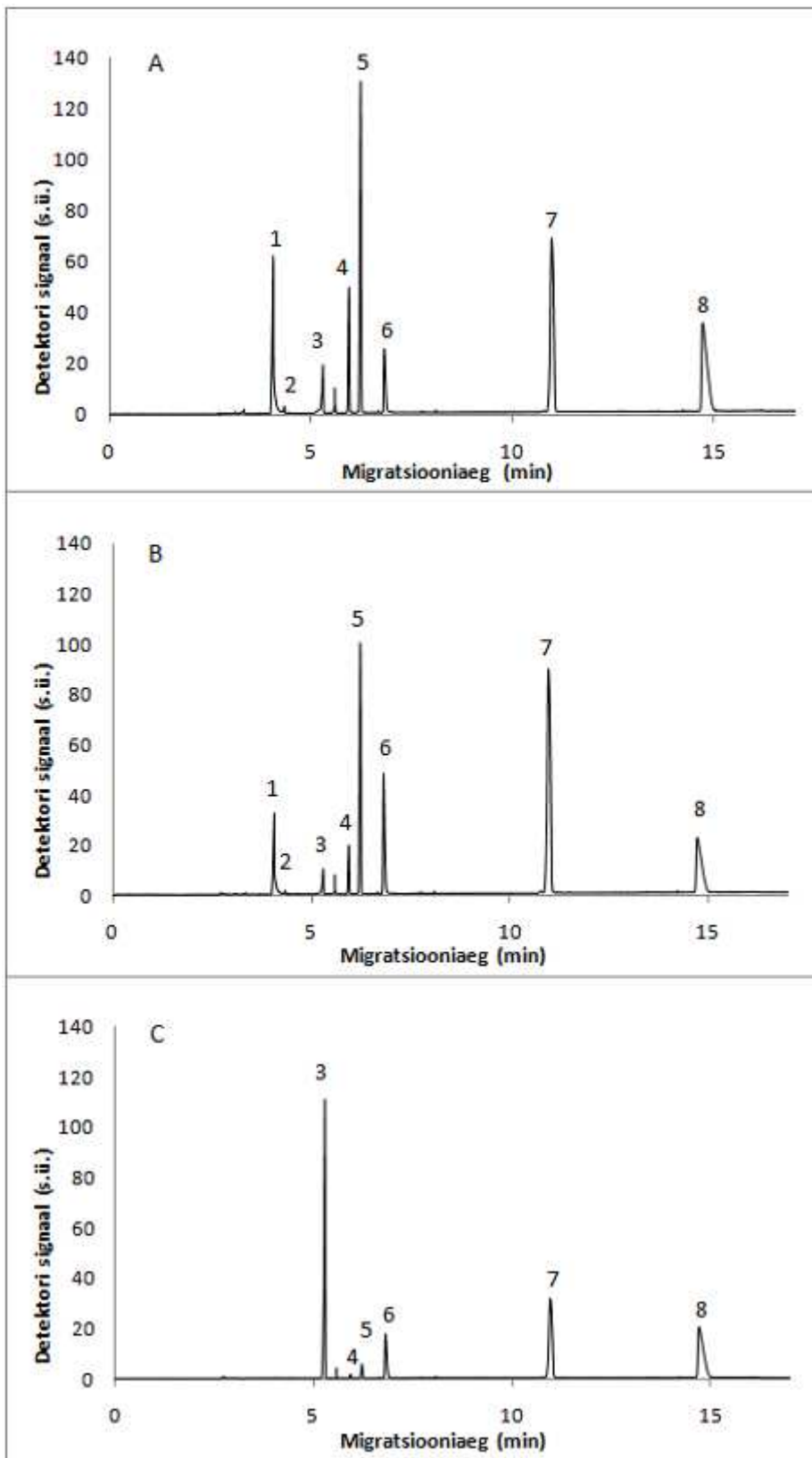
Lähtudes ülalkirjeldatud tulemustest viidi kõik järgnevad analüüsid läbi boraatpuhvriga.

3.2. Lainepikkuste varieerimine

Erinevad ained neelavad UV-kiirgust lainepikkuste varieerimisel erinevalt. Antud töös oli uuritavaid komponente küllalt palju, seega oli vaja leida optimaalne lainepikkus. Katsete käigus detekteeriti sisestatud proove järgnevatel lainepikkustel: 200, 210, 245, 265, 280, 425, 599 nm. On teada, et paljud ained neelavad UV-kiirgust 200 nm ümber, kuid mõnede (nt askorbiinhappe) jaoks on spetsiifilised märksa kõrgemad lainepikkused. Lainepikkuste optimeerimise eesmärgiks oli leida lainepikkuste kogum (maksimaalselt 5 erinevat lainepikkust), millede puhul oleks tagatud kõigi uuritavate ainete maksimaalne detekteeritavus (suurim signaal-müra suhe) ühel valitud lainepikkustest. Lisaks kontrolliti erinevate detekteerimislainepikkuste abil võimalusi ainete täiendavaks identifitseerimiseks nende neeldumiseärasuste alusel. Teiste sõnadega – toetudes kirjanduse andmetele registreeriti signaal ka sellistel kõrgematel lainepikkustel, mille juures eeldatavalt segus olevad ained omavad neeldumismaksimumi.

Võrreldes analüüsitulemusi joonisel 11 näha, et enamik lisaainetest neelavad UV-valguskiirgust kõige paremini 200 nm juures. Erandiks on askorbiinhape, millele on spetsiifiline lainepikkus 265 nm. Nimetatud lainepikkusel suureneb askorbiinhappe piigi pindala ligikaudu 5 korda. 200 nm detekteeritud proovi elektroferogrammil on rohkem piike ja nende suhtelised kõrgused (ja pindalad) on suuremad, lainepikkusel 210 nm

detekteeritud elektroferogrammil on enamike ainepiikide pindalad väiksemad, vaid atsesulfaam K ja erkpunane 4R neelavad sellel lainepikkusel rohkem UV- kiirgust. Kõrgetel lainepikkustel (alates 265 nm) ei ole väiksemaid piike näha, nende neelduvus on drastiliselt vähenenud ja teatud lainepikkustel ei ole võimalik neid taustamürast eristada. Askorbiinhappele spetsiifilisel lainepikkusel (265 nm) on antud töös uuritud ainetest võimalik veel usaldusväärselt detekteerida atsesulfaam K-d, punast ja kollast toiduvärvi. Kollase ja sinise sünteetilise toiduvärvi spektrid näitavad, et nimetatud ainetel on neeldumismaksimumid vastavalt 425 nm ja 599 nm juures. Katsed kinnitasid märgatavat neelduvust nimetatud lainepikkustel, mis jäi siiski alla nende ainete neelduvusele 200 nm juures.



Joonis 11. Kunstliku segu elektroferogrammid, mis näitavad aspartaami (1), patentsinine V (2), askorbiinhappe (3), bensoehappe (4), sahhariini (5), atsesulfaam K (6), erkpunane 4R-i (7) ja tartrasiini (8) lahutust. Kasutati 20 mM boraatpuhvrit, pH 9,5 ja 48,5 cm X 50 µm kvartskapillaari. Neelduvus mõõdeti lainepikkustel (A) 200 nm, (B) 210 nm, (C) 265 nm.

Reaalsete proovide analüüsil valiti registreeritavate lainepikkuste väärtusi sõltuvalt uuritava proovi koostisest. Enamusel katsetel jookidega detekteeriti tulemused lainepikkustel 200 ja 265 nm.

Kõiki lisaainete piike. v.a. askorbiinhappe piiki, on kvantitatiivselt analüüsitud 200 nm juures, C-vitamiini sisalduse mõõtmine viidi alati läbi 265 nm juures.

3.3. Analüüs kaetud kapillaariga

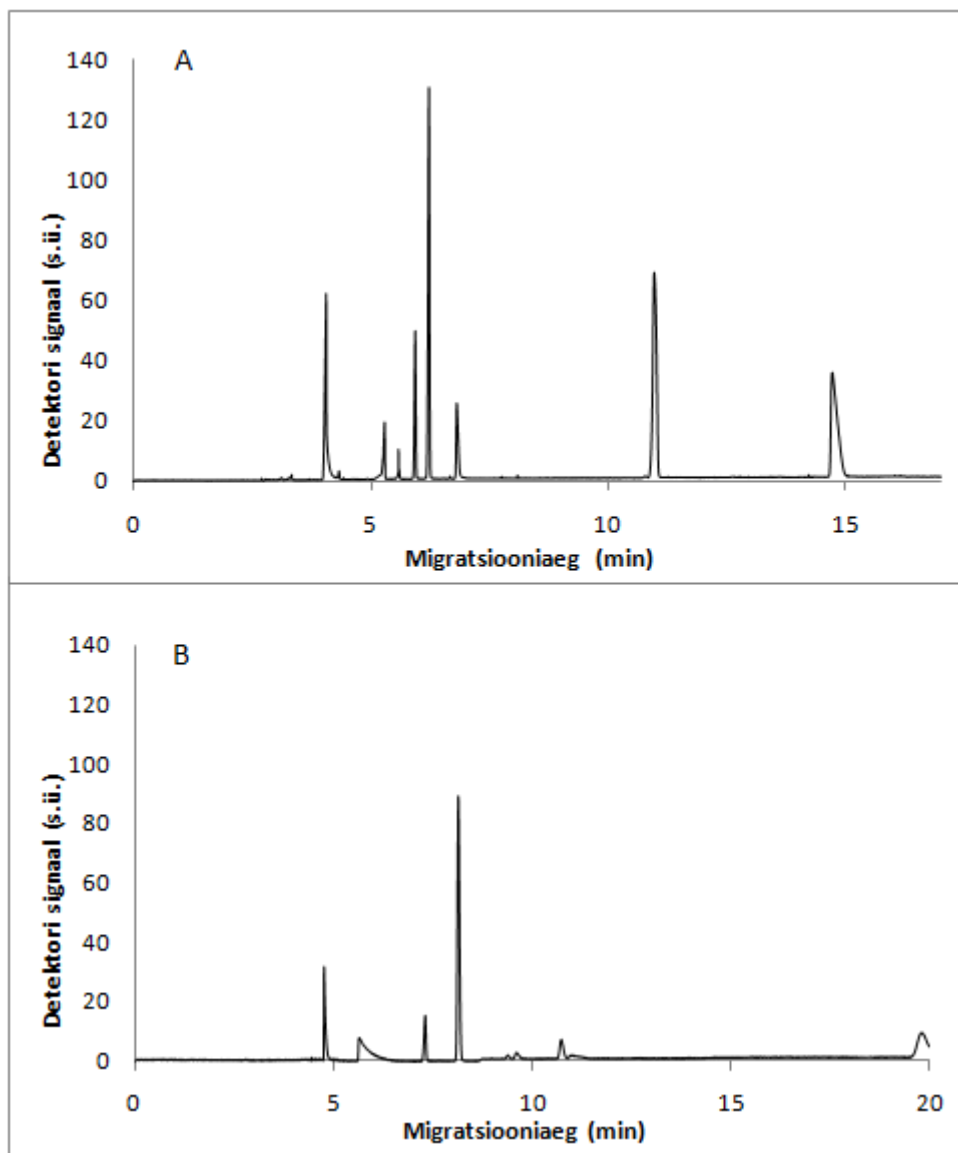
Katsete tegemisel kasutati aluselisi puhversüsteeme, mille pH oli 9,5. Sellel pH väärtusel on kapillaari sisesein saavutanud maksimaalse negatiivse laengu ning puhvri liikumise kiirus (EOF) anoodilt katoodile on samuti omandanud maksimumkiiruse. Uuritavad lisaained on nii aluselises keskkonnas peamiselt anioonsel kujul. See tähendab, et need ained kantakse puhvriga katoodile kuigi nende loomulik liikumissuund on anoodi suunas. Lähtudes nimetatud asjaolust otsustati antud töös uurida, kuidas mõjutab elektroosmootse voo ümberpööramine katsetulemusi. EOF-i juhtimine positiivse elektroodi (anoodi) poole toob endaga kaasa negatiivselt laetud osakeste detekteerimise enne neutraalseid osakesi ja katioone.

Kapillaar kaeti polümeeriga polyE-323 nii nagu on kirjeldatud peatükis 2.3.5.1. PolyE puhul on teada, et see on hüdrofiilne, seda kasutatakse näiteks suurte valkude lahutamisel. PolyE-323 annab stabiilse anoodile suunatud elektroosmoosse voo pH vahemikus 4-9. Kõrgematel pH väärtustel ei ole kirjanduse andmetel antud polümeeri testitud. Katsetes kasutatud puhvrid olid veidi aluselisemad. Seetõttu pidime katseliselt välja selgitama, kas antud polümeer sobib töös uuritud anioonsete ainete lahutamiseks.

Kaetud kapillaariga läbi viidud katsete tulemusi võrreldi katmata kapillaariga teostatud katsete tulemustega. Ootuspäraselt oli uuritavate ainete migreerumise järjekord ümber pööratud – viimased tulid esimesena ja vastupidi. Kuid summaarne analüüsiaeg ei vähenenud vastupidiselt esialgsetele ootustele. Migratsiooniaegade pikenemine oli eriti tuntav standardsegu (vrd joonise 12 A ja B osa), limonaadi ja mahlajoogi puhul.

Võrreldes katmata kapillaariga (prooviks oli standardsegu) läbi viidud katse ferogrammi sama proovi kaetud kapillaariga tehtud katse ferogrammiga, on näha, et mõned ainepiigid kaovad joonistelt. (vt joonist 12) Põhjuseks võib olla piikide signaal-müra suhte

väheneb (polümeer katab ka detektori akna ja suurendab taustmüra). Kaetud kapillaari puhul võib enamike katsete analüüsil täheldada piikide laienemist ja taustamüra suurenemist. Ka lahutusvõime oli halvem kui katmata kapillaariga.



Joonis 12. Standardsegu elektroferogrammid. Kasutati 20 mM boraatpuhvrit, pH 9,5, 48,5 cm X 50 μm (A) katmata kvartskapillaari ja (B) polümeeriga kaetud kapillaari. Neelduvus mõõdeti lainepikkusel 200 nm.

Leidus ka proove, mille puhul kapillaari sisepinna katmine andis paremaid tulemusi. Ainete lahutusvõime paranes ravimi viie kordse lahjendusega läbiviidud katses (vrd lisa 1 jooniseid 19 ja 20). Kui uurida vaid selle proovi komponente, siis võiks kasutada EOF-i ümbersuunamist ja antud polümeeri. Ka mahlajeogis olid kuvatavad piigid ilusad ja taustamüra ei olnud.

Tabelis 4 on toodud kaetud ja katmata kapillaari stabiilsuse võrdlus toetudes bensoehappe standardlahusega sooritatud korduskatsetele. Võrdlus on esitatud lähtudes bensoehappe migratsiooniaegadele. On näha, et suhteline standardhälve kaetud kapillaariga sooritatud katsete jaoks on ligikaudu 6%, katmata kapillaari korral aga ligikaudu 1%.

Üks põhjustest, miks kapillaari katmine antud polümeeriga ei andnud rahuldavaid tulemusi võib olla kasutatud polümeeri ja sellest lähtuvalt ka EOF-i ebastabiilsus kõrgetel pH väärtusel. Järjestikuste katsete puhul oli märgata ainete migratsiooniaegade pikenemist, mis viitab polümeeri lekkimisele. Katmata kapillaariga sooritatud katsed on usaldusväärsemad.

Tabel 4. Kaetud ja katmata kapillaariga tehtud katsete stabiilsuse võrdlus bensoehappe näitel

	Kaetud kapillaar	Katmata kapillaar
Migratsiooniaeg (min)	4,67	6,16
	4,96	5,98
	5,21	6,13
	5,37	6,21
Aritmeetiline keskmine	5,05	6,12
Standardhälve	0,31	0,07
Suhteline standardhälve (%)	6,05	1,10

Lähtudes ülalkirjeldatud tulemustest viidi kõik järgnevad analüüsid läbi hariliku katmata kvartskapillaariga.

3.4. Kapillaartsoonelektroforeesi rakendamine reaalsete proovide analüüsis

Optimiseeritud analüüsimeetodit (20 mM boraatpuhver pH 9,5, katmata kvartskapillaar, detekteerimiseks lainepikkused 200 ja 265 nm) rakendati ka valitud jookide ja ravimi analüüsil. Katsete eesmärgiks oli näidata, et meetod on rakendatav n.ö. reaalsete proovide puhul.

Toodete pakenditel oli kirjas jookides ja ravimis sisalduvad ained. Jookides, kus oli koostisainena ka C-vitamiini, oli kirjas selle sisaldus. (vt tabelit 5)

Esiteks püüti reaalseste proovide elektroferogrammidele identifitseerida ainepiike vastavalt tabelis 5 toodud andmetele. Selgitati välja, kas katsetulemused kattusid tootjapoolse infoga ehk kas joogid ja ravim sisaldasid neid lisaaineid, mis olid kirjas pakendil. Uuriti, kas antud lisaained olid jookide puhul sama hästi lahutunud kui standardsegu puhul.

Tabel 5. Uuritavates jookides ja ravimis sisalduvad lisaained.

	E 210 ²	E 300	E 124	E 131	E 102	E 951	E 950
Mahlajook	+	90 mg/l					
Limonaad	+			+	+		
Sportijook	+	120 mg/l			+		+
Karastusjook						+	+
Ravim			+				

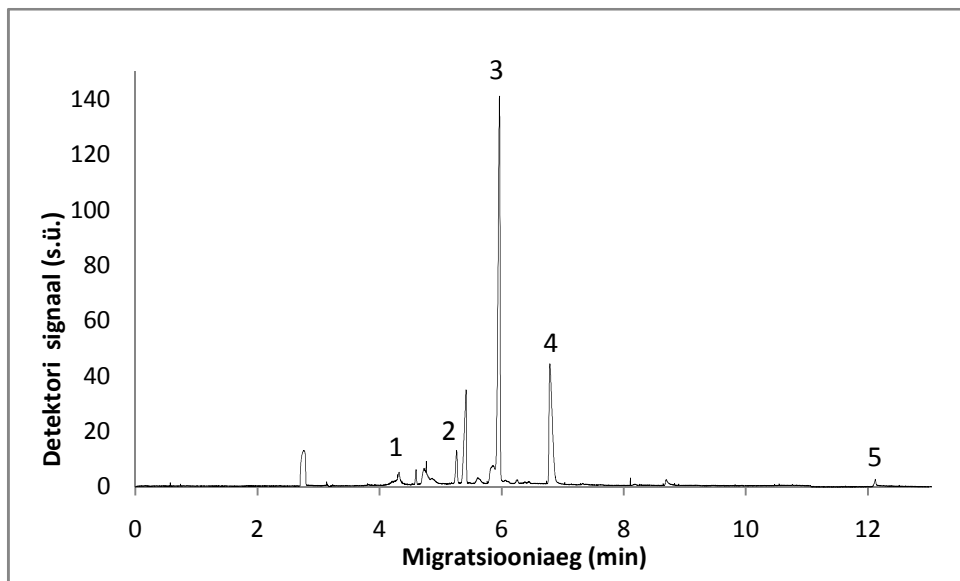
Allikas: Jookide ja ravimi pakendid

Kõikide proovidega läbiviidud katsetes õnnestus identifitseerida uuritavate lisaainete piigid, lisaks detekteeriti jookide ja ravimi kapillaarelektroforeetilisel analüüsil veel teisigi tundmatuid ained, mis neelasid UV-kiirgust detekteerimiseks kasutatud lainepikkusel. Ükski proovides esinenud tundmatu aine ei seganud uuritavate ainete määramist – s.t. nende piigid olid kasutatava puhversüsteemiga huvipakkuvate ainete piikidest piisavalt lahutunud.

Analüüsi seisukohalt võib kõige huvitavamateks katseobjektideks pidada sportijooki ja limonaadi, sest nad sisaldavad antud töös käsitletavaid lisaaineid kõige rohkem. Sportijoojgis õnnestus optimiseeritud katsetingimustel edukalt lahutada askorbiinhape, bensoehape, atsesulfaam K ja tartrasiin. (vt joonist 13) Toiduvärvi migratsiooniaeg on veidi pikem kui 12 min ja tema piik elektroferogrammil on võrreldes kolme eelmisega väga väikene, kuid siiski identifitseeritav.

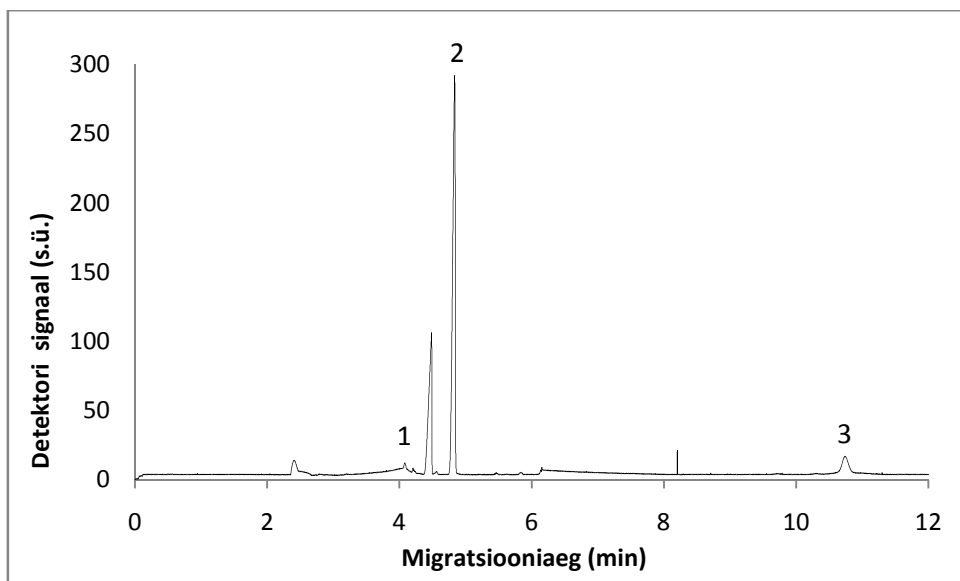
² Säilitusainena lisatakse toitudele bensoaate, mitte bensoehapet, aga töös kasutatava puhversüsteemi juures on selle happe soolad anioonsel kujul ja saab detekteerida bensoehappe neelduvust.

Tootjapoolse info järgi ei tohiks spordijook sisaldada tehislikku magustajat aspartaami, aga võrreldes teiste katsete ferogrammidega, võib väita, et joonisel 13 kujutatud ferogrammil on väga sarnase kuju ja migratsiooniajaga piik, mis teiste katsete puhul vastas kindlasti aspartaamile. Nimetatud piigi pindala kasvas ka seda tehislikku magustajat sisaldava standardi lisamisel. Võib oletada, et spordijook sisaldab mingil määral aspartaami, sest toitudes ja jookides kasutatakse lisandina sageli atsesulfaam K-d ja aspartaami koos (ka karastusjook sisaldas mõlemat magustajat).



Joonis 13. Spordijooi elektroferogramm, mis näitab aspartaami (1), askorbiinhappe (2), bensoehappe (3), atsesulfaam K (4) ja tartrasiini (5) lahutust. Analüüsitimused on samad kui joonise 12 A osa puhul.

Limonaadi ferogrammilt on näha kahte suure signaal-müra suhtega, väga hästi lahutunud ainet. (vt joonist 14) Kõrgem (ja suurema pindalaga) ainepiik kuulub bensoehappele, väiksem piik ainele, mida antud töö raames ei analüüsitud. Lisaks bensoehappele sisaldab limonaad ka sünteetilisi toiduvärve tartrasiin ja patentsinine V-d. Võrreldes spordijooigiga on limonaadi elektroferogrammil kollase toiduvärvi piik suurem, järelikult ka lisaaine sisaldus joogis suurem. Patentsinine V detekteeritakse u 4 min peale katse käivitamist ja olenemata selle piigi väikesest pindalast, oli aine siiski identifitseeritav.



Joonis 14. Limonaadi elektroferogramm, mis näitab patentsinine V (1), bensoehappe (2) ja tartrasiini (3) lahutust. Analüüsi tingimused on samad kui joonise 13 puhul.

Väljatöötatud meetod võimaldas identifitseerida kõik otsitavad ained valitud jookides ja ravimis ning seega võib järeldada, et see sobib uuritavate lisaainete kvalitatiivseks analüüsiks jookides.

3.5. Kvantitatiivne analüüs

Töös uuritud lisaaineid analüüsiti ka kvantitatiivselt, et iseloomustada töös kasutatud kapillaartsoonelektroforeetilise meetodi sobivust ainekoguste määramiseks reaalses proovides. Erandiks on aspartaam ja atsesulfaam K, mille kvantitatiivne analüüs ei osutunud võimalikuks sobivate standardite puudumise tõttu. Seega ei teostatud kvantitatiivset analüüsi karastusjoogis, mis sisaldas antud töö katseobjektidest ainult tehisklikke magustajaid ning ka spordijoojis sai atsesulfaam K puhul piirduda vaid kvalitatiivse analüüsiga.

Lisaainete kontsentratsioonide määramiseks koostati iga aine puhul eraldi kalibreerimissirged. (vt jooniseid 15 ja 16 ning lisa 2 joonised 21-26) Identifitseeritud piikide pindalad mõõdeti ja arvutati ainete kontsentratsioonid kalibratsioonigraafikutelt loetud pindalavõrrandite (vt lisa 2 joonised 21-26) abil. Graafikute koostamiseks oli vaja ferogrammidele määrata ainepiikide kõrgused ja pindalad standardainete erinevate kontsentratsioonide puhul. Nende vahel on lineaarne seos – mida suurem on aine kontsentratsioon lahuses, seda suurem (või kõrgem) on ainepiigi pindala (või kõrgus).

Kalibratsioonigraafikute usaldusväärsust hinnati korrelatsioonikoefitsientide (R^2) alusel. Saadud tulemused on esitatud tabelis 6.

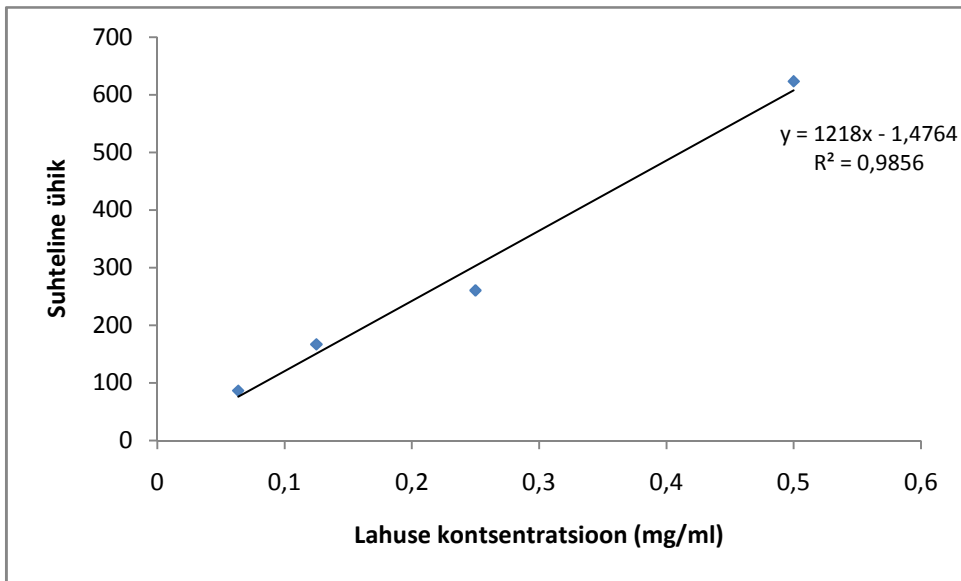
Tabel 6. Korrelatsioonikoefitsientide võrdlus

Kvalitatiivselt analüüsitud lisaaaine	R^2 (piigi pindala järgi)	R^2 (piigi kõrguse järgi)
Bensoehape	0,9993	0,9548
Askorbiinhape	0,9934	0,9589
Erkpunane 4R	0,9953	0,8823
Patentsinine V	0,9985	0,9690
Tartrasiin	0,991	0,9613
Keskmine	0,9955	0,94526

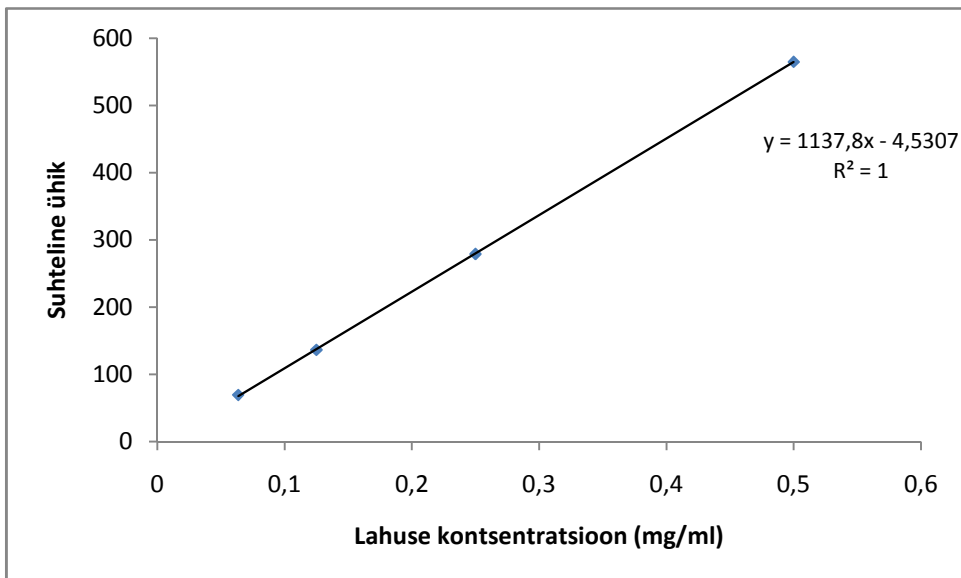
Tabelis 6 olevad koefitsendid on aritmeetilised keskmised kalibratsioonigraafikutest. Andmed puudutavad katmata kapillaariga läbi viidud katseid, sest kaetud kapillaariga kvantitatiivset analüüsi ei sooritatud.

Mida lähemal on R^2 väärtus ühele, seda usaldusväärsem on kvantitatiivne analüüs. Nagu ülaltoodud tabelist on näha, on lineaarne korrelatsioon parem, kui sõltuvus põhineb piigi pindalal. Pindala suurem usaldusväärsus põhineb asjaolul, et kui EOF kiireneb, siis see mõjutab otsekohe piigi kõrgust, kuid pindala sellest ei muutu. Järelikult usaldusväärsemad tulemused kontsentratsioonide määramisel saavutatakse kasutades pindaladel põhinevaid mõõtmisi.

Võrreldes joonistel 15 ja 16 kujutatud kalibratsioonigraafikuid, on näha, kuidas korrelatsioonikoefitsendid iseloomustavad süsteemi stabiilsust. Askorbiinhappele, kui ebastabiilsele ainele, lisati stabilisaatorina mõjuvat ainet (L-tsüsteiini) ja selle tulemusena korrelatsioon kontsentratsiooni ja askorbiinhappe piigi pindala vahel paranes tunduvalt.



Joonis 15. Askorbiinhappe (stabilisaatoriga) kalibratsioonigraafik.



Joonis 16. Askorbiinhappe (stabilisaatorita) kalibratsioonigraafik.

Enamike uuritud lisaainete sisalduse kohta puudus tootjapoolne informatsioon, ainus lisaaine, mille kontsentratsiooni kohta oli tootjapoolne info, oli vitamiin C. Sellepärast kasutati askorbiinhapet kui indikaatorit katsetulemuste kvantitatiivse analüüsi usaldusväärsuse hindamisel.

Tabelist 7 on näha, et leitud askorbiinhappe kontsentratsioonid spordijoogis tulid suuremad kui tootjapoolne info. Ka Tallinna Ülikooli tudengite tehtud laadsetes katsetes olid tulemusteks suuremad näitajad. Selle põhjenduseks võib olla, et tootja peab tagama tootel märgitud C-vitamiini kontsentratsiooni ka realiseerimisaja lõpus. Teatavasti askorbiinhape

laguneb ja võib oletada, et seda lisatakse tootmisel rohkem, et tagada pakendil märgitud kontsentratsioon. Lisaks on Terviseameti Tartu labori andmetel askorbiinhappe analüüsi mõõtemääramatus kuni 45 %. Võttes arvesse viimast on spordijoogi askorbiinhappe sisaldus vägagi lähedane pakendil märgitud väärtusele. Mahlajoogi puhul võib erinevuse põhjustada suurem askorbiinhappe sisaldus joogis.

Tabel 7. Askorbiinhappe kontsentratsioonide võrdlus.

	Tootjapoolne informatsioon	Katsete tulemused	TLÜ tudengite tulemused
Spordijoogis (mg/l)	120	135	138
Mahlajoogis (mg/l)	90	160	Andmed puuduvad

Allikas: Tallinna Ülikooli tudengite ja autori andmed.

Lisaks oli võimalik võrrelda katsetulemusi osade Terviseameti Tartu labori avaldatud andmetega, et kontrollida katsete käigus väljatöötatud meetodi usaldusväärsust. Olemasolevate andmete alusel saab võrrelda limonaadis sisalduvate sünteetiliste toiduvärvide kontsentratsioone. (vt tabelit 8)

Tabel 8. Tartrasiini ja patentsinine V kontsentratsioonide võrdlus limonaadis.

	Terviseameti Tartu labori andmed	Katsete tulemused
Tartrasiin (mg/l)	7,07	5,1
Patentsinine (mg/l)	1,88	1,4

Allikas: Terviseameti Tartu labori ja autori andmed.

Tabelis 8 on esitatud limonaadis sisalduvate sünteetiliste toiduvärvide leitud kontsentratsioonid. Tulemused on erinevad, aga mõõtemääramatus Terviseameti laboris toiduvärvidele on 25 %, lisaks on tegemist erinevate jookide partiidega ja ei ole teada kas ja kui palju värvainete kontsentratsioon jookides kõigub.

Iseloomustamiseks süsteemi sobivust kvantitatiivseks analüüsiks, mõõdeti bensoehappe piikide pindala varieeruvust paralleelkatsete jooksul ja saadi suhteliseks standardhälbe väärtuseks keskmiselt 2 %.

Leitud lisaainete kontsentratsioonid on loetletud koondavas tabelis (vt tabel 9).

Tabel 9. Katsete tulemusena leitud lisaainete kontsentratsioonid (mg/l) analüüsitud jookides ja ravimis.

	E 210	E 300	E 102	E124	E 131
Mahlajook	67,99	160			
Limonaad	71,92		9,4		1,4
Spordijook	125	135	2,35		
Ravim				9,5	

Toetudes paralleelkatsete sarnasusele, kalibreerimisgraafikute lineaarsusele ning tulemuste võrdlusele nii tootjapoolse informatsiooniga kui ka Terviseameti Tartu labori andmetega võib järeldada, et väljatöötatud kapillaartsoonelektroforeetiline meetod omab potentsiaali toidu lisaainete kvantitatiivseks määramiseks jookides. Samas on usaldusväärse kvantitatiivse analüüsimeetodi välja arendamiseks vaja läbi viia täiendavaid katseid reaalsete proovidega.

Kokkuvõte

Uurimistöö käigus otsiti optimaalseid katsetingimusi huvipakkuvate toidu lisaainete samaaegseks kapillaartsoonelektroforeetiliseks analüüsiks. Katsete käigus varieeriti puhversüsteeme ja lainepikkusi. Omavahel võrreldi katmata kapillaari (seinalaeng negatiivne, puhvri liikumissuund katoodi poole) modifitseeritud kapillaariga, mille seinalaeng oli positiivne ning puhver liikus anoodi suunas. Uuritavates jookides ja ravimis identifitseeriti neis sisalduvaid lisaaineid. Elektroferogrammidele mõõdeti tuvastatud ainete piikide pindalad ja kõrgused, mille alusel viidi läbi kvantitatiivne analüüs.

Puhvrite analüüsil osutus sobivaimaks 20 mM boraatpuhver pH väärtusega 9,5, mille puhul oli ainepiikide signaal-müra suhe suurem ja lisaainete keskmine lahutuvus parem kui karbonaatpuhvrit kasutades.

Optimaalseks lainepikkuseks osutus 200 nm, mille juures oli standardsegu puhul parim neelduvus. Askorbiinhappe tuvastamiseks ja kontsentratsiooni määramiseks kasutati talle spetsiifilist lainepikkust 265 nm. Sünteetilistele toiduvärvidele iseloomulikud kõrged lainepikkused võeti kasutusele värvainete täiendavaks identifitseerimiseks, värvainete kvantitatiivsel analüüsil osutus otstarbekamaks kasutada lainepikkusel 200 nm saadud tulemusi, kuna antud lainepikkusel olid piikide signaal-müra suhted suuremad.

Kapillaari katmine polümeeriga ei toonud oodatud tulemusi. Vastupidiselt arvatule ainete migratsiooniajad pikenesid ja lahutuvus ei paranenud. Põhjuseks on arvatavasti liiga aluseline puhver. Sobivaks osutus harilik katmata kvartskapillaar.

Uurimistöö käigus töötati välja meetod toidu lisaainete esialgseks analüüsiks jookides. Tulemuste alusel võib öelda, et sissejuhatuses püstitatud hüpotees leiab kinnituse. Kapillaartsoonelektroforees sobib antud lisaainete samaaegseks analüüsiks ja on piisavalt kiire ja usaldusväärne ka ebastabiilsete ainete puhul. Kemikaalide, proovide ja jääkide väikese kulu tõttu kvalifitseerub antud lahutusmeetod keskkonnasäästlike alla.

Kapillaartsoonelektroforees õigustab ennast alternatiivse meetodina juba kasutusel olevatele analüüsimeetoditele.

Kuigi töö käigus jõuti soovitud tulemuseni, ei kvalifitseeru esitatud meetod rutiinseks kvantitatiivseks analüüsiks ja vajab veel edasist uurimist.

Kasutatud materjalid

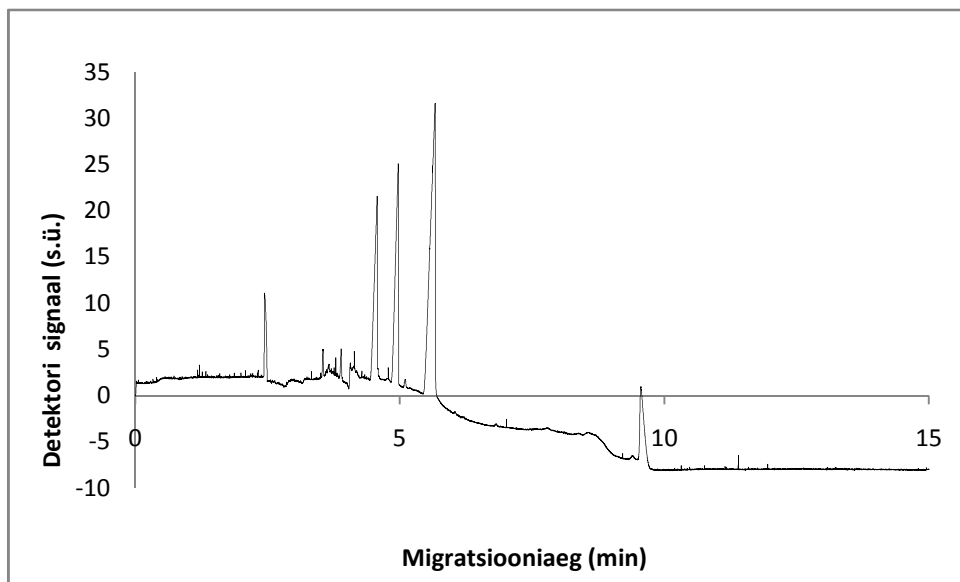
1. Coultate, T.P. (2009) Food: The Chemistry of its Components (5th Edition). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
2. Chen, Q.-C., Wang J. (2001) Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparation by ion chromatography. – Journal of Chromatography A, Vol. 937, pp. 57-64.
3. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration 31. Detsembri 2003. a dokumendi sisukokkuvõte nr 2002F-0220 1. artikkel.
4. Dunn, A. J. (1997) Developments in European Union legislation on food preservatives. – Food Chemistry, Vol. 60, No. 2, pp. 187-191.
5. Emerton, V., Choi, E. (2008) Essential Guide to Food Additives (3rd Edition). Leatherhead and Cambridge: Leatherhead Publishing and Royal Society of Chemistry.
6. Euroopa Ühenduste Nõukogu 21. detsembri 1988. a direktiiv 89/107/EMÜ 1. artikli 2. punkt.
7. Frazier, R. A., Inns, E. L., Dossi, N., Ames J. M., Nursten, H. E. (2000) Development of a capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of artificial sweeteners, preservatives and colours in soft drinks. – Journal of Chromatography A, Vol. 876, pp. 213-220.
8. Garcia- Jimenez, J. F., Velencia, M. C., Capitan-Vallvey L. F. (2007) Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. – Analytica Chimica Acta, Vol. 594, pp. 226-233.

9. Gold, M.D. The Bitter Truth About Artificial Sweeteners. Kättesaadav: <http://www.ivanfraser.com/articles/health/aspartame.html>, 12.10.2009.
10. Heiger, D. (2000) High performance capillary electroforesis. Germany: Agilent Technologies.
11. Kaljurand, M., Kuldvee, R. (1997) Instrumentaalanalüüs III. Tallinn: TTÜ Keemiasinstituut.
12. Keemilised riskitegurid toidus, nende esinemine, mõjud tervisele, kontroll ja vältimise teed. Kättesaadav: http://www.tervisekaitse.ee/documents/toit/Keemilised_riskitegurid_toidus.pdf, 04.01.2010. (Keemilised riskitegurid...: 2004)
13. Kuo, K.-L., Hsieh, Y.-Z. (1997) Determination of preservatives in food products by cyclodextrinmodified capillary electrophoresis with multiwavelength detection. – Journal of Chromatography A, Vol. 768, pp. 334-341.
14. Leis, Riina (Terviseameti Tartu labor kvaliteedijuht). Autori intervjuu. Üleskirjutus. Tartu: 30.12.2009.
15. Li, X.Q., Zhang, F., Sun, Y.Y., Yong, W., Chu, X.G., Fang, Y.Y., Zweigenbaum, J. (2008) Accurate screening of synthetic preservatives in beverage using high performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. – Analytical Chimica Acta, Vol. 608, pp. 165-177.
16. Nobeli preemia kodulehekül. Kättesaadav: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/tiselius-bio.html, 16.01.2010.
17. Patent Blue V. Kättesaadav: <http://chemicalland21.com/lifescience/foco/PATENT%20BLUE%20V.htm>, 04.01.2010.

18. Pesek, J. J., Matyska, M. T. (1997) Determination of aspartame by high-performance capillary electrophoresis. – Journal of Chromatography A, Vol. 781, pp. 423-428.
19. Ponceau 4R. Kättesaadav: [http://www.sensient-fce.com/synthetic-colours-pp.html?&L=0"&tx_svssenscolor_pi1\[showUid\]=43&cHash=6e53c7cd1c](http://www.sensient-fce.com/synthetic-colours-pp.html?&L=0), 04.01.2010.
20. Raudsepp, K. (2009) Askorbiinhappe kapillaartsoonelektroforeetiline analüüs mahlades ja puuviljades. Tallinn: Tallinna Reaalkool.
21. Skoog, D. A., Holler, F.J, Niemann, T.A. (1998) Principles of Instrumental Analysis (5th Edition). USA: Harcourt Brace & Company.
22. Stoker, H.S. (2004) General, Organic, and Biological Chemistry (3rd Edition). Boston and New York: Houghton Mifflin Company.
23. The Swiss Laboratory for Doping Analyses koduleht. Kättesaadav: <http://www.doping.chuv.ch/en/lad-ec-zone-eng.jpg>, 30.01.2010.
24. Zilmer, M., Karelson, E., Vihalemm T., Rehema A., Zilmer K. (2006) Inimorganismi biomolekulid ja metabolism. Tallinn: Avita.
25. Zygler, A., Wasik, A., Namiesnik, J. (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuff. Elsevier Ltd.
26. Tartrazine. Kättesaadav: [http://www.sensient-fce.com/synthetic-colours-pp.html?&L=0"&tx_svssenscolor_pi1\[showUid\]=48&cHash=33bcda99d4](http://www.sensient-fce.com/synthetic-colours-pp.html?&L=0), 04.01.2010.
27. Ullsten, S., Zuberovic, A., Wetterhall, M., Hardenborg, E., Markides, K. E., Bergquist, J. (2004) A polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins and peptides. – Electrophoresis 2004, Vol. 25, pp. 2090-2099.

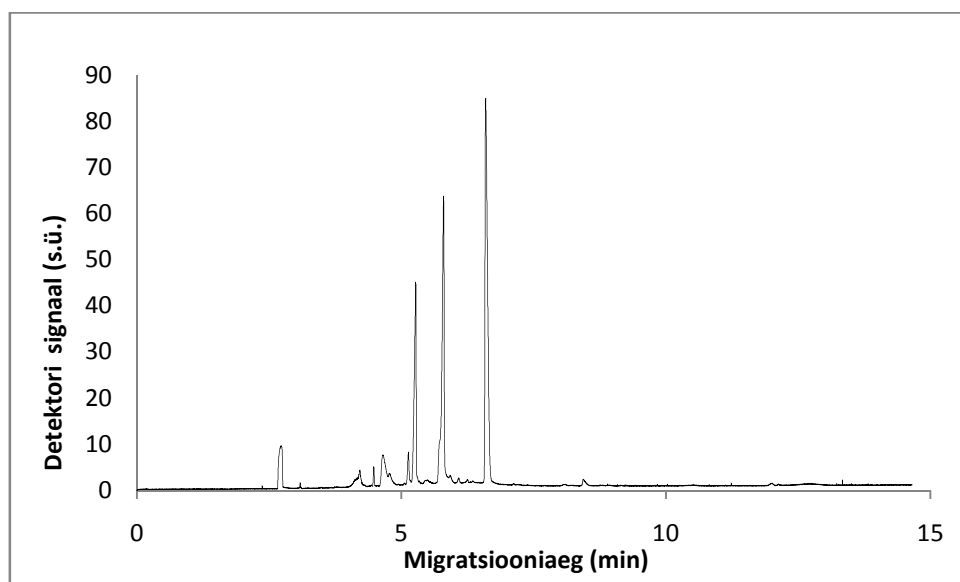
28. Yoshioka, N., Ichihashi, K. (2008) Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. – *Talanta*, Vol. 74, pp. 1408-1413.

Lisa 1 Elektroferogrammid



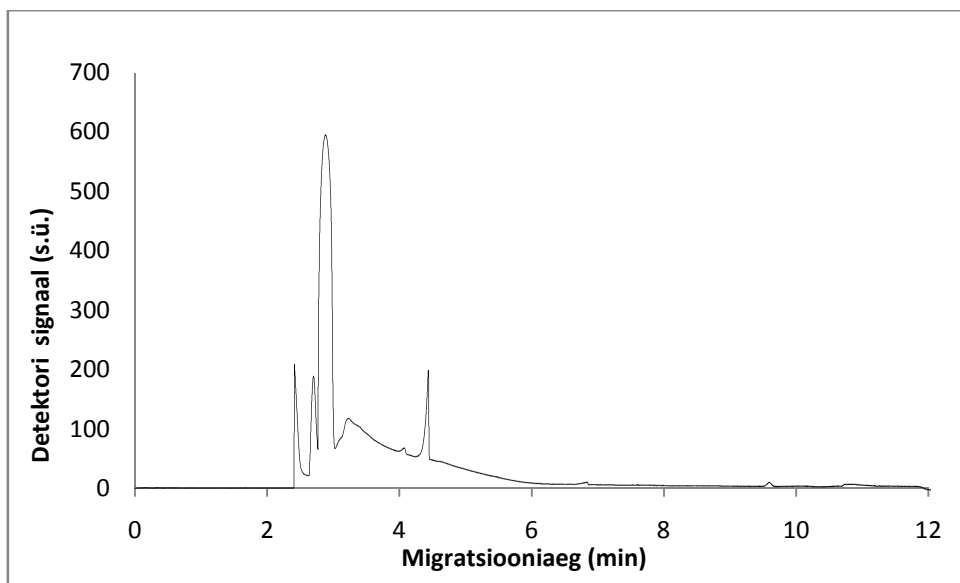
Joonis 17. Spordijoogi elektroferogramm. Kasutati 20 mM karbonaatpuhvit, neelduvus mõõdeti lainepikkusel 210 nm. Muud analüüsitingimused on samad, mis joonise 13 puhul.

Allikas: Tallinna Ülikooli tudengite andmed.

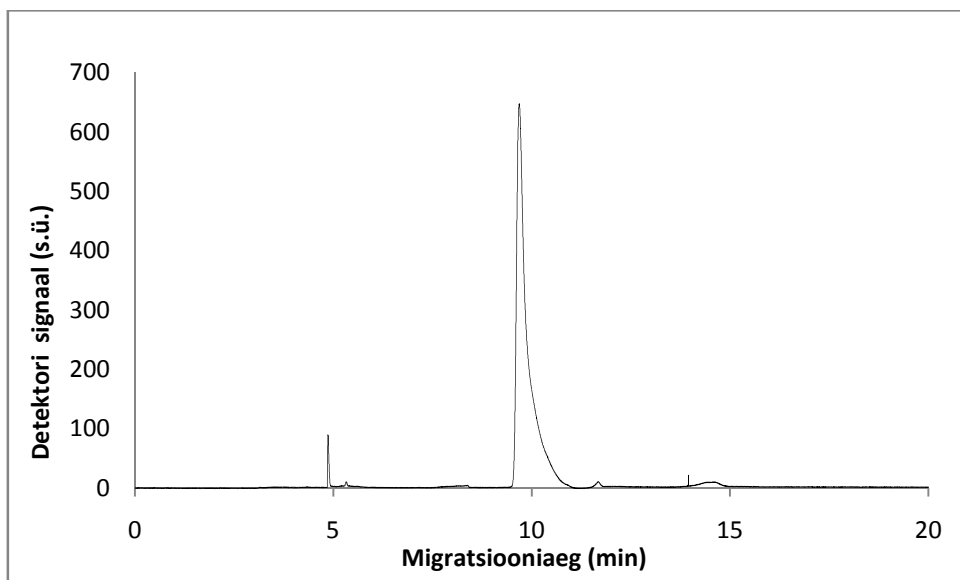


Joonis 18. Spordijoogi elektroferogramm. Neelduvus mõõdeti lainepikkusel 210 nm. Muud analüüsitingimused on samad, mis joonise 13 puhul.

Allikas: Tallinna Ülikooli tudengite andmed.

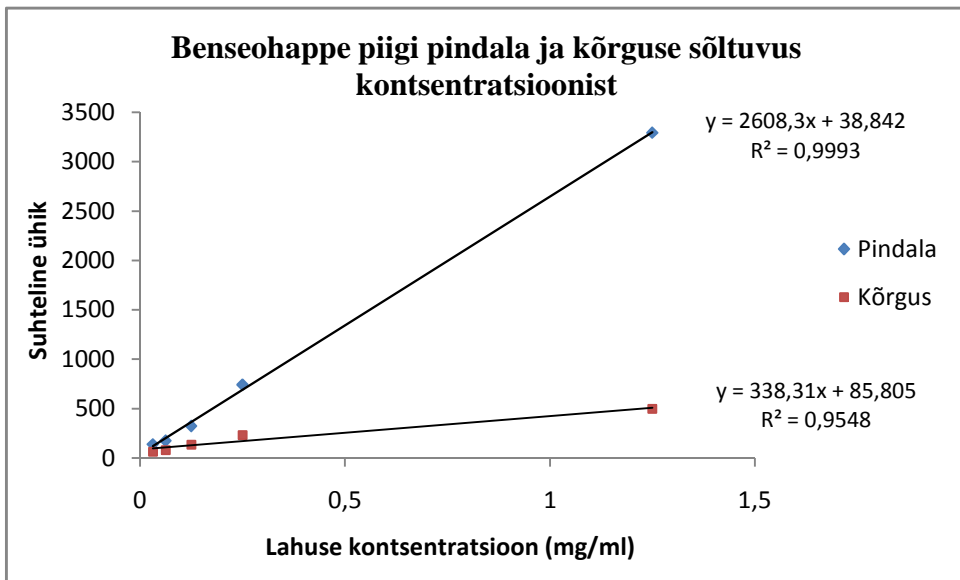


Joonis 19. Ravimi elektroferogramm. Analüüsitingimused on samad, mis joonise 13 puhul.

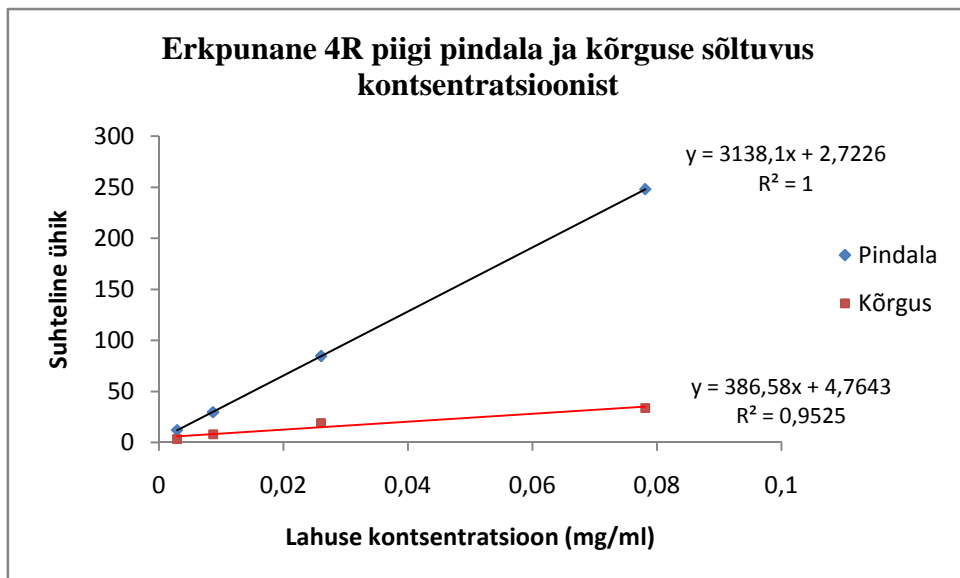


Joonis 20. Ravimi elektroferogramm. Analüüsitingimused on samad, mis joonise 12 B osa puhul.

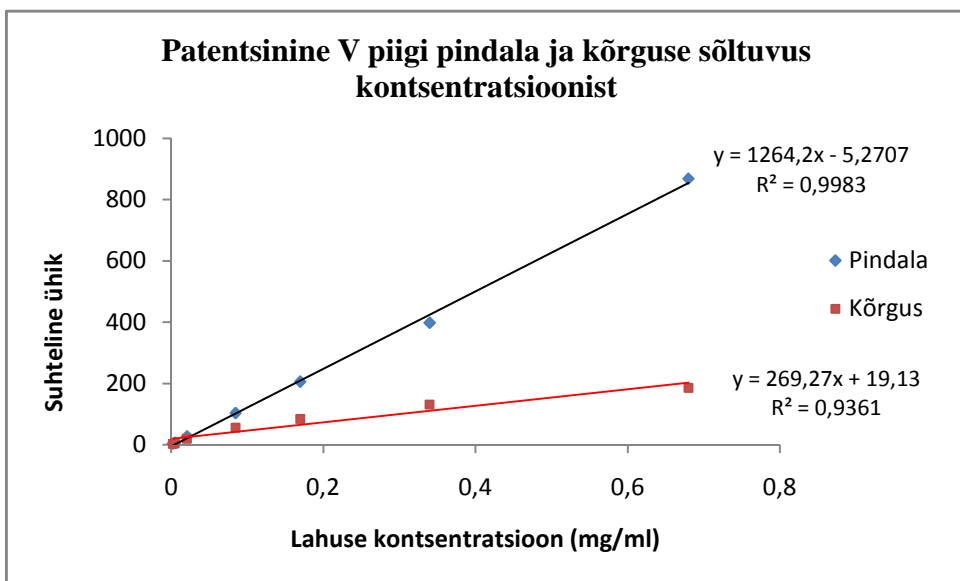
Lisa 2 Kalibratsioonigraafikud



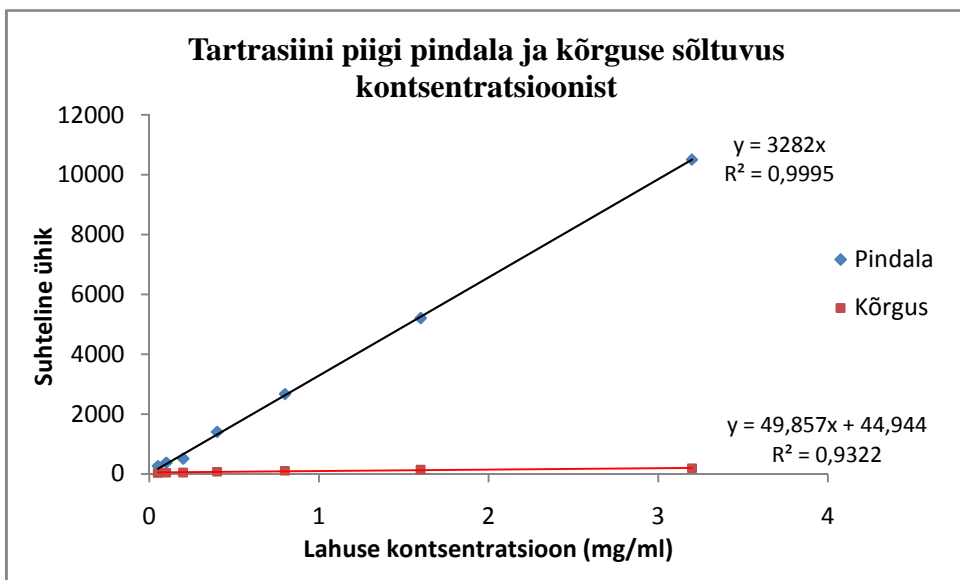
Joonis 21. Benseohappe kalibratsioonigraafik.



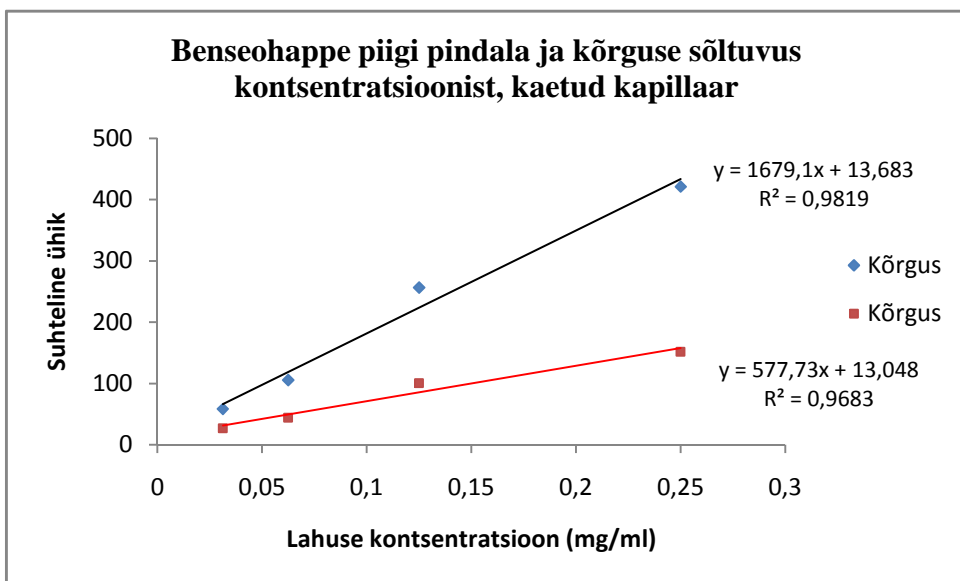
Joonis 22. Erkpunane 4R-i kalibratsioonigraafik.



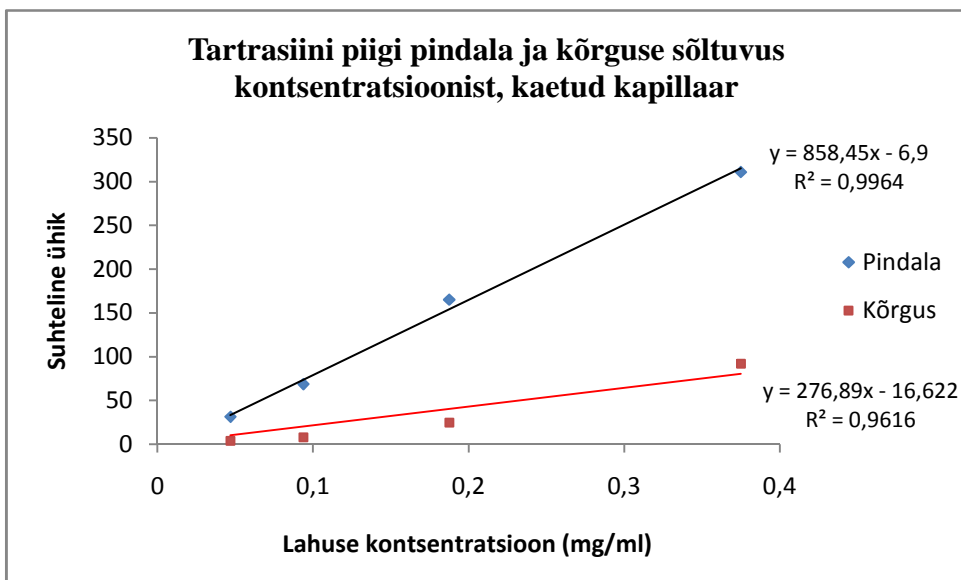
Joonis 23. Patentsinine V kalibratsioonigraafik.



Joonis 24. Tartrasiini kalibratsioonigraafik.



Joonis 25. Benseohappe kalibratsioonigraafik, kaetud kapillaar.



Joonis 26. Tartrasiini kalibratsioonigraafik, kaetud kapillaar.

Lisa 3 Tabelid

Tabel 10. Informatsioon uuritavate toidu lisaainete kohta.

	E-number	ADI (mg/kg)	Molaar-mass (g/mol)	pK _a väärtus	Negatiivsete laengute arv pH 9,5 juures
Bensoehape	E210	5	122	4,21	1
Askorbiinhape	E300	1000 ³	176	4,17 ja 11,6	1
Erkpunane 4R	E124	4	604	11,19	ligikaudu 0
Patentsinine	E131	15	567	7,63	1
Tartrasiin	E102	7,5	534	9,43	1
Aspartaam	E951	0-40	294	4,5-6	1
Atsesulfaam K	E950	0-15	201	- ⁴	1

³ Päevane ohutu totaalkogus kestval manustamisel (3-6 kuud)

⁴ Tegemist on soolaga

Resümee

Uurimistöo “Kapillaarelektroforeetilise meetodi väljatöötamine toidu lisaainete analüüsiks jookides” eesmärk oli välja töötada kiire, usaldusväärne ja keskkonnasäästlik meetod bensoehappe, askorbiinhappe, erkpunane 4R, patensinine V, tartrasiini, aspartaami ja atsesulfaam K samaaegseks kvantitatiivseks analüüsiks erinevates jookides ja ravimis.

Uurimistöo hüpotees oli, et kapillaarelektroforeetiline meetod on piisavalt kiire ja usaldusväärne toidu lisaainete (sealhulgas ebastabiilsete ainete) analüüsiks jookides ja on täiendavaks meetodiks klassikaliste analüüsimeetodite kõrval.

Katsete käigus kasutati erinevaid puhversüsteeme ja lainepikkuseid. Võrreldi harlikku kvartskapillaari kaetud kapillaariga, kus polümeerse ainega kasutati PolyE-323-e. Sobivaks osutus katmata kapillaar.

Optimaalseks lainepikkuseks valiti 200 nm, ainult askorbiinhappe tuvastamiseks ja kontsentratsiooni määramiseks kasutati talle spetsiifilist lainepikkust 265 nm. Sobivaks puhversüsteemiks osutus 20 mM boraatpuhver pH väärtusega 9,5.

Tulemuste alusel võib öelda, et püstitatud hüpotees leidis kinnituse. Uurimistöo käigus töötati välja usaldusväärne lahutusmeetod toidu lisaainete esialgseks analüüsiks jookides, mis rutiinsel tasemel kasutamiseks vajab siiski täiendavaid analüüse.

Resume

The aim of the research „Development of a capillary electrophoresis method for the analysis of food additives in beverages“ was to develop a rapid, reliable and environmentally friendly method for the simultaneous determination of benzoic acid, ascorbic acid, ponceau 4R, patent blue V, tartrazine, aspartame and acesulfame K in various drinks and a drug.

The hypothesis was that capillary electrophoresis method is sufficiently rapid and reliable for the analysis of food additives (including unstable additives) in beverages and is a sufficient alternative to other methods of chemical analysis.

During the experiments, different buffer systems and wavelengths were used. Regular quartz capillary was compared to a coated capillary. A polymeric substance, polyE, was used. The uncoated capillary turned out to be more efficient.

The separation of mixtures of these additives was successfully accomplished using capillary electrophoresis under optimised conditions utilising a 20 mM borate buffer at pH 9.5. The absorbance was measured at 200 nm with the exception of ascorbic acid (265 nm).

After evaluating the results the hypothesis was confirmed. When applied to retail beverages and a drug, this method enabled the reliable determination of additives, but before this method can be used for routine analysis it will be necessary to perform further validations.