

# Određivanje koncentracije konzervansa u bezalkoholnim pićima metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti

---

Ivezić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:611888>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Sara Ivezić

**Određivanje koncentracije konzervansa u  
bezalkoholnim pićima metodom tekućinske  
kromatografije visoke učinkovitosti**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2020.



Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar” pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Bošnjir. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.



## **Zahvale**

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Bošnjir, dipl. san. ing. na ukazanoj prilici za rad na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar” te ažurnosti i strpljenju. Hvala prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na ljubaznosti te pomoći pri usavršavanju diplomskoga rada.

Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci kroz sve lijepe, a i one manje lijepe trenutke tijekom ovih pet godina.



# Sadržaj

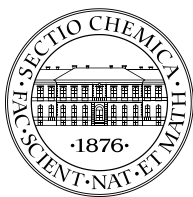
|   |            |
|---|------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>   | <b>X</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                               | <b>2</b>   |
| <b>2.1. Aditivi u hrani .....</b>                                   | <b>2</b>   |
| 2.1.1. Toksikološka ocjena aditiva .....                            | 3          |
| 2.1.2. Prihvatljivi dnevni unos .....                               | 4          |
| <b>2.2. Konzervansi .....</b>                                       | <b>5</b>   |
| 2.2.1. Podjela konzervansa .....                                    | 5          |
| 2.2.2. Benzojeva kiselina i njezine soli.....                       | 7          |
| 2.2.3. Sorbinska kiselina i njene soli.....                         | 9          |
| 2.2.4. Ostali konzervansi.....                                      | 10         |
| <b>2.3. Osvježavajuća bezalkoholna pića .....</b>                   | <b>11</b>  |
| <b>2.4. Štetni učinci konzervansa na ljudsko zdravlje .....</b>     | <b>13</b>  |
| 2.4.1. Štetni učinci benzojeve kiseline i njenih soli.....          | 14         |
| 2.4.2. Štetni učinci sorbinske kiseline i njenih soli .....         | 15         |
| 2.4.3. Štetni učinci ostalih konzervansa.....                       | 16         |
| <b>2.5. Analitičke metode određivanja prehrambenih aditiva.....</b> | <b>16</b>  |
| 2.5.1. Kromatografske tehnike .....                                 | 17         |
| <b>2.6. Validacija analitičke metode .....</b>                      | <b>19</b>  |
| <b>2.7. Javno mišljenje o prehrambenim aditivima .....</b>          | <b>21</b>  |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                               | <b>23</b>  |
| <b>3.1. Materijali i metode.....</b>                                | <b>23</b>  |
| 3.1.1. Kemikalije .....   | 23         |
| 3.1.2. Korišteni instrumenti.....                                   | 23         |
| 3.1.3. Uvjeti rada kromatografa .....                               | 23         |
| 3.1.4. Priprema mobilne faze .....                                  | 24         |
| 3.1.5. Priprema uzorka .....  | 24         |
| 3.1.6. Tijek metode.....  | 24         |
| 3.1.7. Kalibracija .....  | 25         |
| 3.1.8. Identifikacija .....   | 27         |
| 3.1.9. Kvantifikacija.....  | 27         |



---

|   |     |
|---|-----|
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA .....           | 28  |
| 4.1. Parametri validacije.....            | 29  |
| § 5. ZAKLJUČAK .....                      | 35  |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 36  |
| § 7. LITERATURNI IZVORI.....              | XV  |
| § 8. ŽIVOTOPIS .....                      | XVI |





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Određivanje koncentracije konzervansa u bezalkoholnim pićima metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti

Sara Ivezić

Konzervansi su sastojci prirodnog ili sintetskog podrijetla čija je uloga sprječavanje, usporavanje ili zaustavljanje rasta mikroorganizama, sprječavanje propadanja hrane i produljenje njezinog roka trajanja. Određivanje koncentracije benzojeve i sorbinske kiseline u 25 bezalkoholnih pića provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti s UV detektorom (HPLC/UV) koja je prethodno validirana te su izračunati validacijski parametri. Svih 25 analiziranih pića sadržava dva navedena konzervansa unutar dozvoljene koncentracijske granice koja iznosi  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Granične vrijednosti udjela benzojeve kiseline određene su u pojedinim negaziranim i izotoničnim pićima na bazi voća, a sorbinske kiseline u nekoliko gaziranih i negaziranih pića te energetskom piću.

(38 stranica, 9 slika, 7 tablica, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb u Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: benzojeva kiselina, bezalkoholna pića, HPLC, konzervansi, sorbinska kiselina

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Bošnjir, dipl. san. ing.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. prof. dr. sc. Ines Primožič
3. prof. dr. sc. Željka Soldin

Zamjena: prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 18. prosinca 2020.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Determination of preservative concentration in soft drinks by high performance liquid chromatography

Sara Ivezić

Preservatives are ingredients of natural or synthetic origin whose role is to prolong foods shelf life. This might be via preventing, slowing down or stopping the growth of microorganisms or any other deterioration process. Two commonly used preservatives are benzoic acid and sorbic acid. They were quantitatively determined in 25 commercially available soft drinks by high performance liquid chromatography with UV detector (HPLC/UV). The method used was validated and the corresponding validation parameters were calculated.

All 25 analyzed beverages contain the two listed preservatives less than the maximum level given of 250 mg L<sup>-1</sup>. Limit values for benzoic acid were found in some non-carbonated and isotonic fruit-based beverages, and sorbic acids in several carbonated and non-carbonated beverages and energy drinks.

(38 pages, 9 figures, 7 tables, 28 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: benzoic acid, HPLC, preservatives, soft drinks, sorbic acid

Mentor: Dr. Jasna Bošnjir, Professor

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Ines Primožič, Professor
3. Dr. Željka Soldin, Professor

Substitute: Dr. Sanda Rončević, Professor

Date of exam: 18<sup>th</sup> December, 2020



## § 1. UVOD

U današnjem svijetu, zdravstvena ispravnost hrane i pića te njihov odgovarajući izgled i okus predstavljaju bitne značajke koje moraju biti zadovoljene s obzirom na njihovu sve veću proizvodnju i potrošnju. Kako bi se zadovoljili svi uvjeti, hrani i piću dodaju se razni aditivi. Prema zakonima Europske unije, aditivi su definirani kao tvari koje se same po sebi ne konzumiraju kao hrana i nisu uobičajen sastojak hrane, bez obzira imaju li neku hranjivu vrijednost ili ne. Aditivi se dodaju hrani pri proizvodnji, obradi, pakiranju, transportu i skladištenju te postaju izravno ili neizravno njezin sastavni dio.<sup>1</sup>

Konzervansi su najvažnija skupina aditiva, a koriste se u svrhu očuvanja sigurnosti i dostatnosti zaliha svjetske hrane. Za produljenje trajnosti, sprječavanje kvarenja i trovanje hranom kao posljedice mikrobne kontaminacije hrane koriste se različite vrste konzervansa. Učinak kemijske tvari koja se koristi kao konzervans često je upitna, kao i sigurnost hrane koja sadrži konzervanse. Učinak prehrambenih konzervansa na zdravlje može biti trenutačan ili može, pri konstantnoj izloženosti, uzrokovati dugoročne posljedice. Cilj ovoga rada je utvrditi sadržaj najčešće korištenih konzervansa (sorbinska i benzojeva kiselina ili njihove soli) prisutnih u osvježavajućim bezalkoholnim pićima. Radom će se obuhvatiti osvježavajuća bezalkoholna pića domaćih i stranih proizvođača kojima će se metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti odrediti udio sorbinske i benzojeve kiseline i/ili njihovih soli. Navedeni konzervansi su ograničeno dozvoljeni aditivi čija je maksimalno dozvoljena količina propisana Uredbom br. 1333/2008 Europskog Parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. godine o prehrambenim aditivima. Dobiveni rezultati analize aditiva u uzorcima pića usporedit će se s vrijednostima propisanim Uredbom. Iz podataka o dnevnoj potrošnji osvježavajućih bezalkoholnih pića utvrdit će se dnevni unos konzervansa u organizam i procijeniti moguće posljedice konzervansa na ljudsko zdravlje.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Aditivi u hrani

Hrana, kao glavni izvor energije, vitamina i ostalih korisnih tvari, potrebna je svakom biću za uspješan rast i razvoj. Upravo zbog toga, dodatkom prehrambenih aditiva određene se prehrambene namirnice tijekom procesa proizvodnje mijenjaju u svrhu poboljšanja njihovih svojstava. Aditivi su prema definiciji tvari koje se same po sebi ne konzumiraju kao hrana i nisu uobičajen sastojak hrane. Dodatak aditiva hrani ima svojih prednosti ukoliko se koriste u točno određenim i propisanim količinama koje dokazano nemaju štetne učinke na ljudsko zdravlje. Općenito, aditive niti jedna zemlja ne zabranjuje u potpunosti, ali svaka ima određene zakonske propise vezane za njih. Za određivanje aditiva u prehrambenim proizvodima razvijene su i unaprijeđene brojne analitičke metode koje se koriste u različite svrhe, od kvantifikacije aditiva, do provjere stabilnosti ili postupaka obrade hrane.<sup>1</sup>

Prehrambeni aditivi koriste se u razne svrhe, od poboljšanja sigurnosti hrane, dodavanja boja i okusa, izmjene teksture hrane pa sve do njenog konzerviranja. Neki aditivi mogu imati više od samo jednog svojstva, kao na primjer kiseline koje hrani daju osebujan okus, a ujedno i sprječavaju rast mikroorganizama koji dovode do njenog kvarenja. Uobičajeno su aditivi kemijske tvari, ali se u tu svrhu mogu koristiti i enzimi. Takav primjer je kimozin, enzim koji se dodaje mlijeku u svrhu proizvodnje sira. Do danas je poznat veliki broj tvari koje se koriste kao aditivi, čak njih više od 3000, a u hrani se nalaze kao posljedica direktnog ili indirektnog dodavanja. Indirektnim aditivima smatraju se tvari koje su nenamjerno dospjele u hranu iz okoliša tijekom proizvodnje, obrade i pakiranja kao što su primjerice sastojci ambalaže, teški metali, aflatoksin i pesticidi. Direktni aditivi su tvari dodane kako bi se postigao neki željeni efekt, kao na primjer bojila, konzervansi, antioksidansi i zaslađivači. Osim podjele na direktne i indirektno, aditivi se dijele i na prirodne i sintetičke. Prirodni aditivi pojavljuju se u samoj hrani ili se ekstrahiraju iz prirodnih izvora, dok su sintetički napravljeni od strane čovjeka.<sup>2</sup>

Za opis aditiva koriste se kodni brojevi, tzv. E brojevi, koji se koriste u svrhu identificiranja aditiva u hrani, ali samo onih koji su prethodno proglašeni sigurnim za



upotrebu i službeno odobreni u Europskoj uniji.<sup>3</sup> Prema E brojevima (tablica 1), aditivi se dijele u nekoliko skupina prema njihovoj funkciji u prehrambenim proizvodima.<sup>2</sup>

Tablica 1. Prikaz kvalifikacije aditiva po E brojevima.

| <b>E brojevi</b> | <b>Opis funkcije</b>                   |
|------------------|--|
| E100-E199        | Boje                                   |
| E200-E299        | Konzervansi                            |
| E300-E399        | Antioksidansi, regulatori kiselosti    |
| E400-E499        | Stabilizatori, emulgatori, zgušnjivači |
| E500-E599        | Antiaglomeranti, regulatori kiselosti  |
| E600-E699        | Pojačivači okusa                       |
| E700-E799        | Antibiotici                            |
| E900-E999        | Tvari za zaslađivanje i glaziranje     |

Aditivi se dijele na bojila, antioksidanse i regulatore kiselosti, zgušnjivače, stabilizatore i emulgatore, regulatore pH, pojačivače okusa, antibiotike te sredstva za glaziranje, zaslađivače i konzervanse.<sup>2</sup>

### *2.1.1. Toksikološka ocjena aditiva*

Prije odluke da se određena tvar može smatrati prehrambenim aditivom, potrebno je izraditi njenu tehničku specifikaciju. U tehničkoj specifikaciji podataka navodi se kemijski naziv, kemijska struktura tvari, fizikalno-kemijska svojstva, način dobivanja ili sinteze, mikrobiološki kriteriji, naznaka vrste mikroorganizma ili genetski modificiranog organizma ukoliko je aditiv dobiven takvim postupkom. Također, važno je navesti analitičku metodu kojom se analizira čista tvar kao i metodu analize aditiva u hrani, moguću reaktivnost te postojanost u hrani, navesti kolike su potrebne koncentracije aditiva, na koji način ih je najprikladnije primijeniti te jednoznačnost ili višeznačnost djelovanja.<sup>4</sup>

Nakon što je određena tvar svrstana u prehrambene aditive, slijedi njezino toksikološko ispitivanje i preporuke kako bi se konačno koristila u procesu proizvodnje prehrambenih namirnica. Istraživanja uključuju akutni, subakutni i kronični toksicitet te kancerogenost, a neka detaljnija metabolizam/toksikokinetiku, genotoksičnost, alergnost, imunotoksičnost, neurotoksičnost te toksičnost u reprodukciji i razvoju.<sup>4</sup>

Osim praćenja utjecaja aditiva na reproduktivni i razvojni tijek, metaboličkim i farmakokinetičkim istraživanjima prati se utjecaj aditiva nakon njihove resorpcije u tijelu, vrijeme izlučivanja, dok se molekularno-genetskim metodama određuju moguće promjene u stanicama. Potrebno je promatrati i interakciju aditiva s lijekovima i ostalim sastojcima prehrambenih proizvoda. Nakon provedenih svih potrebnih istraživanja, utvrđuje se najveća količina aditiva kod koje nisu uočeni nikakvi toksični učinci na zdravlje (engl. *No observed adverse effect level*, NOAEL) i najmanja količina aditiva koja može djelovati štetno (engl. *Lowest observed adverse effect level*, LOAEL). Poznavajući ove dvije vrijednosti, odredi se prihvatljivi dnevni unos (engl. *Acceptable daily intake*, ADI) aditiva u organizam. Proteklih nekoliko desetljeća, broj aditiva koji su dopušteni za upotrebu nije se znatno mijenjao. Nekoliko ih je dodano na listu dopuštenih aditiva, a nekoliko uklonjeno s popisa aditiva dopuštenih za ljudsku upotrebu.<sup>4</sup>

### 2.1.2. Prihvatljivi dnevni unos

Prihvatljivi dnevni unos (ADI) je ona količina aditiva koja se može svakodnevno konzumirati cijelog života, a da ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Izražava se za svaki aditiv kao maseni udio, mg/kg tjelesne mase čovjeka. U tablici 2 prikazani su prihvatljivi dnevni unosi i najveće dopuštene količine benzojeve i sorbinske kiseline te njihovih soli.

Tablica 2. Prihvatljivi dnevni unosi te najveće dopuštene količine benzojeve i sorbinske kiseline te njihovih soli.<sup>4</sup>

| <b>E broj</b> | <b>Naziv aditiva</b> | <b>ADI u mg/kg/tm dnevno</b>       | <b>NDK u mg/kg</b>  |
|---------------|----------------------|------------------------------------|---|
| E200          | sorbinska kiselina   | 25                                 | za različitu hranu različito;<br>u osvježavajućim pićima<br>300 mg        |
| E202          | kalijev sorbat       | izraženo kao sorbinska<br>kiselina |   |
| E203          | kalcijev sorbat      |                                    |   |
| E210          | benzojeva kiselina   | 5                                  | od 150 mg/kg u<br>osvježavajućim pićima<br>do 2000 mg u<br>drugim hranama |
| E211          | natrijev benzoat     | izraženo kao benzojeva<br>kiselina |   |
| E212          | kalijev benzoat      |                                    |   |
| E213          | kalcijev benzoat     |                                    |   |

Na temelju dosadašnjih istraživanja aditiva može se procijeniti njihov utjecaj na ljudsko zdravlje. Ukoliko vrijednost ADI za pojedini aditiv nije određena, znači da sami aditiv

najvjerojatnije nema štetne učinke. Unatoč tome, koncentracija dodanog aditiva mora biti što manja i prihvatljivih, što manjih udjela koji nisu štetni za ljudsko zdravlje.<sup>4</sup>

## 2.2. Konzervansi

Konzervansi su definirani kao sastojci koji mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla, a čija je uloga sprječavanje, usporavanje ili zaustavljanje rasta mikroorganizama ili bilo kakvog propadanja hrane te produljenje njezinog roka trajanja. Kao i preostale tvari dodane prehrambenim namirnicama u svrhu poboljšanja njihovih svojstava, konzervansi također moraju imati određena svojstva: ne smiju štetiti zdravlju potrošača i usporavati probavne enzime, raspasti se u toksične tvari nakon konzumacije, trebaju imati prikladnu metodu proizvodnje te se trebaju moći lako identificirati i kvantificirati radi lakše kontrole kvalitete.<sup>5</sup>

Konzerviranje hrane koristile su mnoge civilizacije u prošlosti, poput Egipćana, Kineza, Rimljana i Grka, koji su hranu čuvali u glinenim spremnicima. Jednima od najstarijih konzervansa smatraju se sol i šećer čijim dodatkom nastaje visok osmotski tlak koji uklanja vodeni medij potreban bakterijama za život i reprodukciju.<sup>5</sup>

Bezalkoholna pića sadrže različite sastojke poput vitamina i minerala koji omogućavaju rast mikroorganizama (nizak pH uslijed otapanja ugljikovog dioksida pogoduje rastu), a prisutni šećeri i dodatak konzervansa sprječavaju rast mikroba. Izbor konzervansa za pojedino piće prvenstveno ovisi o kemijskim i fizikalnim svojstvima konzervansa kao i samoga pića. Osim toga, na odabir prikladnog konzervansa utječu i pH, sadržaj vitamina, način pakiranja i uvjeti skladištenja.<sup>5</sup>

### 2.2.1. Podjela konzervansa

Sprječavanje kvarenja hrane ili uništavanje mikroorganizama temelj je konzerviranja hrane. Kako same fizikalne metode poput smrzavanja ili termičkog obrađivanja nisu pogodne za svaku vrstu hrane, poseže se i za kemijskim konzervansima. Konzervansi su sastojci koji potječu iz prirodnih ili sintetičkih izvora te se tako dijele na prirodne i umjetne, a svaki od njih je dalje podijeljen u podskupine prema svojoj ulozi. Konzervansi su podijeljeni u dvije klase, klasu I koju čine prirodni konzervansi (sol, šećer, ocat i sl.) i klasu II, odnosno kemijske ili sintetske konzervanse (npr. natrijevi i kalijeve benzoati, sorbati, nitriti, nitrati, sulfiti...). Navedene klase konzervansa se dalje dijele na 3 vrste. Prvu vrstu čine antioksidansi

koji zaustavljaju raspad masti i ulja u hrani koji se javlja u prisutnosti kisika. Oni se dalje dijele na prave antioksidanse, reducense i sinergiste antioksidansa. Drugu vrstu predstavljaju antimikrobne tvari pomoću kojih se uništava ili odgađa rast mikroorganizama (bakterija, kvasca ili plijesni). Ovoj vrsti pripadaju nitriti i nitrati koji sprječavaju botulizam te benzoati i sorbati kao antifungalni posrednici. Antienzimski konzervansi čine treću vrstu. Koriste se za zaustavljanje enzimskih procesa, poput zrenja, a mogu dovesti do kvarenja namirnica, npr. nakon berbe.<sup>5</sup>

Umjetno proizvedeni konzervansi mogu imati velik broj različitih funkcija kojima sprječavaju kvarenje namirnica. Tako primjerice antioksidansi smanjuju oksidativnu štetu nastalu djelovanjem reaktivnih spojeva, to jest inhibiraju oksidaciju reakcijom sa slobodnim radikalima. Sorbinska kiselina, benzojeva kiselina i njihove soli na razne načine sprječavaju rast bakterija, plijesni i kvasaca. Koriste se u bezalkoholnim, gaziranim te voćnim sokovima jer su učinkovite u rasponu pH od 2-4. Iako se ti spojevi smatraju sigurnim, postoje ograničenja za njihov udio u konačnom proizvodu kojim se žele izbjeći akutna ili kronična otrovanja.<sup>5</sup>

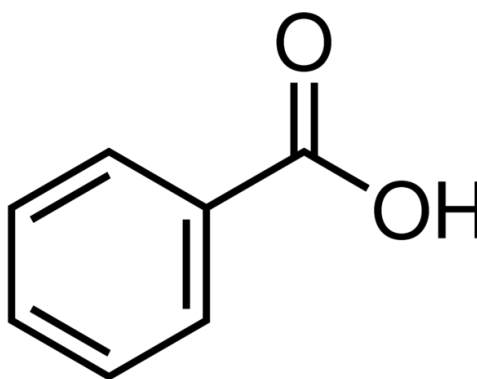
Organskim kiselinama, poput benzojeve i sorbinske kiseline, antimikrobna svojstva poboljšavaju se dodatkom drugih konzervansa, povećanjem topline, niskim aktivitetom vode ( $a_w$ ) pomoću kojeg je moguće kontrolirati rast i razvoj mikroorganizama. Većina bakterija ne može rasti pri vrijednosti  $a_w$  nižoj od 0,91, dok plijesni mogu živjeti pri  $a_w$  većem od 0,80 te niskim temperaturama skladištenja.<sup>6</sup>

Ukoliko se koristi više kemijskih konzervansa, treba pripaziti na njihov međusobni učinak kako ne bi došlo do štetnih posljedica za ljudsko zdravlje. U današnje vrijeme, potrošači se sve više okreću namirnicama koje sadrže prirodne konzervanse kao alternativu sintetskim. Za to je zaslužan porast svijesti kupaca o mogućim štetnim utjecajima umjetno proizvedenih konzervansa na zdravlje. Podatci izdani od strane Mintela (londonska firma za istraživanje tržišta, *Global Market Research & Market Insight*) pokazali su kako se plasiranje proizvoda s prirodnim aditivima u globalnoj prehrambenoj industriji u par godina povećalo za 4%, a udio proizvoda s umjetnim smanjio sa 65% na 61%. Prirodnim konzervansima smatraju se tvari dobivene tretiranjem biljaka za koje se zna da imaju kontrolu nad rastom mikroba zbog svoje kemijske raznolikosti. To su najčešće esencijalna ulja dobivena iz biljaka bogatih terpenima. Neki od najpoznatijih prirodnih konzervansa korištenih u bezalkoholnim

pićima su algin, karagenan, limunska kiselina, med, guar guma, eritorbična kiselina, ekstrakt ružmarina itd.<sup>5</sup>

### 2.2.2. Benzojeva kiselina i njezine soli

Benzojeva kiselina (slika 1), konzervans pod brojem E210, bezbojna je aromatska karboksilna kiselina prirodno prisutna u biljkama, gljivičnim i životinjskim tkivima, može biti proizvedena mikroorganizmima, ali i dodana hrani kao aditiv.



Slika 1. Strukturna formula benzojeve kiseline.<sup>8</sup>

(ilustracija preuzeta s

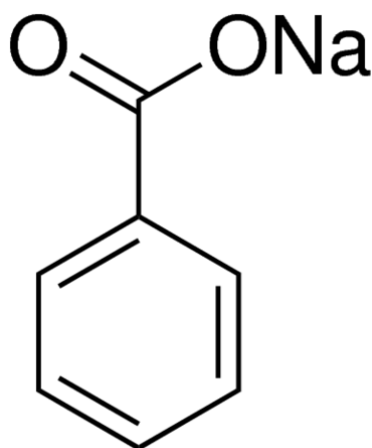
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/242381?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite\\_-\\_caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_benzoic%20acid\\_-\\_srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/242381?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_benzoic%20acid_-_srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.))

Uloga ovog aditiva je spriječiti rast bakterija i gljivica ili kao sredstva za aromatiziranje. Iako nedisocirani oblik benzojeve kiseline ima bolja antimikrobna svojstva, soli benzojeve kiseline se zbog bolje topljivosti u vodi češće upotrebljavaju kao aditiv u hrani. Za antimikrobno djelovanje najpovoljniji je raspon pH od 2,5-4,5. Pri uporabi benzojeve kiseline treba osobito paziti da bitno ne promijeni okus hrane. Poznato je kako ima i neke negativne učinke, primjerice izaziva oralni svrbež, povećava percepciju slatkoće, znatno smanjuje okus gorčine te smanjuje okus kiselosti i slanosti.<sup>7</sup>

Benzojeva kiselina u nedisociranom obliku može na više načina inhibirati rast mikroorganizama, najčešće promjenom u proizvodnji energije ili slabljenjem funkcije

stanične membrane. Nedisocirana benzojeva kiselina topljiva je u staničnoj membrani i pri tome djeluje kao ionofora, molekula koja će omogućiti prolaz iona kroz membranu, u ovom slučaju protona. Kontinuiranim ulaskom protona u stanicu, stanica troši energiju pokušavajući održati optimalni pH unutar citoplazme.<sup>6</sup>

Kako bijeli kristali benzojeve kiseline nisu dobro topljivi u vodi, njezina je primjena otežana u proizvodima koji sadržavaju veće količine vode. Stoga se u tim slučajevima koristi njezina sol topljiva u vodi, bijeli kristalni ili amorfni praškasti, natrijev benzoat (E211). Natrijev benzoat (slika 2) sam po sebi nema konzervirajuća svojstva sve dok se njegovim dodatkom ne poveća kiselost pića pri čemu dolazi do nastajanja nedisocirane benzojeve kiseline.<sup>9</sup>



Slika 2. Strukturna formula natrijevog benzoata.<sup>12</sup>

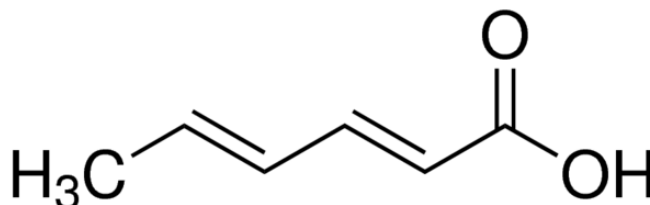
(ilustracija preuzeta s

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18106?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite\\_-\\_caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_sodium%20benzoate\\_-\\_srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18106?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_sodium%20benzoate_-_srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.))

U lužnatom mediju, benzojeva kiselina će se disocirati na ione i time izgubiti svoja svojstva.<sup>9</sup> Sol benzojeve kiseline manje je toksična od same kiseline što je prednost pri njejoj uporabi u prehrambenoj industriji.<sup>10</sup> Metabolizira se unutar mitohondrija proizvodeći hipurat koji se izluči bubrezima.<sup>11</sup>

### 2.2.3. Sorbinska kiselina i njene soli

Sorbinska kiselina (E200) je dvostruko nezasićena masna kiselina sa šest ugljikovih atoma (slika 3).



Slika 3. Strukturna formula sorbinske kiseline.<sup>14</sup>

(ilustracija preuzeta s

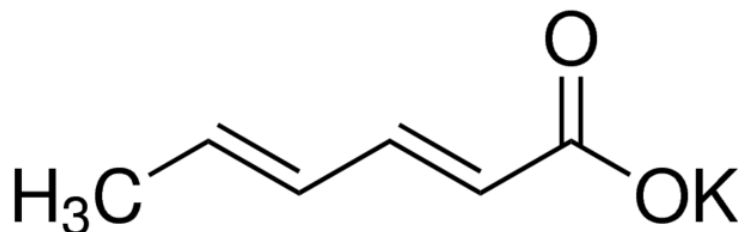
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1626?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_sorbic%20acid-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1626?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_sorbic%20acid-_-srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.))

Kao i benzojeva kiselina, sorbinska kiselina je također slabo topljiva u vodi pa se češće upotrebljava njena sol, kalijev sorbat. Aktivna je u nedisociranom obliku što ovisi o vrijednosti pH. Ova skupina konzervansa najučinkovitija je protiv kvasaca i plijesni, dok nisu posebno učinkoviti u sprječavanju razvoja bakterija.<sup>13</sup>

Sorbinska kiselina te njezine soli, kalijev sorbat i kalcijev sorbat, smatraju se sigurnim i netoksičnim konzervansima, najčešće kao zamjena za benzojevu kiselinu u prehrambenoj industriji. Iako su to kiseli konzervansi, optimalan pH za njihovu upotrebu je u rasponu od 5-6. U ljudskom se tijelu metaboliziraju i oksidiraju u ugljikov dioksid i vodu i ne zadržavaju se u tijelu. Većim dijelom, od 80-86% navedenih konzervansa ukloni se kroz pluća u obliku CO<sub>2</sub>, manjim dijelom 2-10% putem mokraće kao urea te u manjim koncentracijama kao mukonska i sorbinska kiselina.<sup>9</sup>

Sorbinska kiselina i njene soli imaju ograničenu antimikrobnu aktivnost. Učinkovitije su protiv katalaza-pozitivnih nego katalaza-negativnih organizama te aerobnih naspram anaerobnih organizama što ih čini pogodnima za konzerviranje fermentirane hrane. Uzrok tomu je inhibiranje rasta patogena poput *Escherichia coli*, *staphylococci* i *Salmonella typhimurium*, a ujedno ne sprječavaju daljnji razvoj bakterija mliječne kiseline.<sup>15</sup>

Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja sorbata još uvijek nije točno određen. Kod kalijeveg sorbata (slika 4) djelovanje je vjerojatno posljedica njegovog ugljikovodičnog lanca.



Slika 4. Strukturna formula kalijeveg sorbata.<sup>17</sup>

(ilustracija preuzeta s

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/85520?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite--caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_potassium%20sorbate--srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/85520?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite--caSrpResults_srpRecs_srpModel_potassium%20sorbate--srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.))

Smatra se kako sorbati inhibiraju rast mikroba tako što mijenjaju morfologiju i funkciju stanične membrane te inhibiraju prijenosne funkcije i metaboličku aktivnost. Također, mogu utjecati na supstrate pojedinih enzima što uzrokuje smanjen prijenos pojedinih proteina u bakteriju, a vezanjem na membranu dolazi do poremećaja funkcije aktivnih membranskih transportnih proteina. Drugi mehanizam kojim se objašnjava djelovanje sorbata je kako sorbat troši previše stanične energije jer utječe na staničnu stimulaciju, signaliziranje i odgovor na stres. Smrt mikroba nastaje nakon značajnijeg povećanja koncentracije sorbata zbog oštećenja na površini stanične membrane.<sup>16</sup>

#### 2.2.4. Ostali konzervansi

Sumporov dioksid i sulfiti poznati su kao vrlo učinkoviti konzervansi koji se koriste već stoljećima. Sumporov dioksid poznat je po svom učinkovitom sprječavanju rasta bakterija, plijesni i kvasca dok se sulfiti, uz antimikrobnu aktivnost, također koriste kao antioksidansi, sredstva protiv smeđenja te kao stabilizatori boja. Slobodni ionski oblici sulfita aktivniji su od vezanog oblika sumporovog dioksida. Spojevi sumpora ili njihove soli u pićima imaju antiseptičku i antioksidativnu ulogu. Kako bi određeni spoj ili njegova sol mogli obavljati funkciju antiseptika, potrebno je da njihov udio bude najmanje 0,1 %, a ukoliko služe kao



antioksidansi, dovoljan je i udio od 0,02 %. Pri pH manjem od 4, njihov učinak raste te je stoga sumporov dioksid idealan za upotrebu u bezalkoholnim pićima. Antimikrobna aktivnost sulfita smanjuje se njihovim vezivanjem s određenim mikrobnim metabolitima i sastojcima sokova.<sup>18</sup>

Poznato je kako se od davnina kao konzervans koristio anorganski nitrat unatoč saznanju da je potrebno reducirati ga u nitrit kemijskim putem ili enzimima kako bi dobio antimikrobna svojstva. Prije navedene redukcije nitrat ne reagira s organskim molekulama. Tijekom skladištenja, nitrat je reduciran u nitrit i dušikov oksid bakterijskim djelovanjem, ali brzinu te reakcije nije moguće predvidjeti niti kontrolirati. Nitriti u mesnim proizvodima reagiraju s pigmentima, proteinima i mastima iako detalji tih mehanizama nisu u potpunosti razjašnjeni. Osim što su učinkoviti u sprječavanju rasta ozbiljnih patogena, nitriti mišićnom tkivu vraćaju svjetloružičastu boju mesa proizvodnjom nitrozomioglobina.<sup>19</sup>

### 2.3. Osvježavajuća bezalkoholna pića

Prema Pravilniku o temeljnim zahtjevima za osvježavajuća bezalkoholna pića i soda-vodu, osvježavajućim bezalkoholnim pićima smatraju se proizvodi dobiveni određenim tehnološkim postupcima od vode ili mineralne vode, šećera, voćnog soka, koncentriranog voćnog soka, voćne pulpe, voćnog mark (srži), voćne baze, biljnih ekstrakata, žitarica, proizvoda od žitarica, sirutke, proizvoda od sirutke, sirupa za osvježavajuća bezalkoholna pića, s dodatkom ili bez dodatka ugljikovog dioksida i aditiva dopuštenih ovim Pravilnikom. Ti proizvodi se s obzirom na to koje sastojke i aditive sadrže, na tržištu označavaju kao: osvježavajuće bezalkoholno piće od voćnog soka, osvježavajuće bezalkoholno piće od voćne baze, osvježavajuće bezalkoholno piće od biljnih ekstrakata, osvježavajuće bezalkoholno piće od žitarica ili sirutke i umjetno osvježavajuće bezalkoholno piće.<sup>20</sup>

Osvježavajuće bezalkoholno piće od voćnog soka bistri je ili mutni proizvod načinjen od vode ili mineralne vode, šećera i/ili umjetnog sladila, voćnog soka, koncentriranog ili dehidratiranog voćnog soka, s dodatkom ili bez dodatka ugljikovog dioksida i dopuštenih aditiva. U ovu vrstu pića moguće je dodati razne šećere, ugljikov dioksid te voćne sokove, pulpe i mark (srž). Ukoliko ne sadržavaju ugljikov dioksid, na tržište se plasiraju kao negazirana osvježavajuća bezalkoholna pića. Potrebno je istaknuti vrstu voća od kojeg je piće

proizvedeno te dati podatke o postotku suhe tvari, voćnog soka te količini ugljikovog dioksida ukoliko ga ima.<sup>20</sup>

Osvježavajućim bezalkoholnim pićima od voćnih baza smatraju se bistri ili mutni proizvodi dobiveni od vode ili mineralne vode, šećera i/ili umjetnog sladila, citrus-baza odnosno voćnih baza s dodatkom ugljikovog dioksida i aditiva. U slučaju proizvodnje pića tipa bitter, dopušta se uporaba kininova hidroklorida. Ova pića osim već navedenih sastojaka mogu sadržavati i citrusne baze ili voćne baze, šećere i sirutku. Na tržište se također mogu plasirati kao negazirana pića uz navođenje korištene vrste voća. Pića od voćnih baza moguće je proizvoditi od više vrsta voćnih baza te mješavine citrus-baza i voćnih baza. Njihova deklaracija mora sadržavati podatke o postotku suhe tvari i količinu ugljikovog dioksida te podatak o količini kinina u slučaju korištenja.<sup>20</sup>

Pod osvježavajućim bezalkoholnim pićima od biljnih ekstrakata smatraju se bistri ili mutni proizvodi dobiveni od vode ili mineralne vode, šećera i/ili umjetnih sladila i biljnih ekstrakata, s dodatkom ugljikovog dioksida i aditiva dopuštenih Pravilnikom. Navedeni biljni ekstrakti obično su aromatični ekstrakti isključivo biljnog podrijetla, dopušteni za ljudsku prehranu, koji potječu od jedne vrste ili od više vrsta bilja, a dobivaju se vodenom ili alkoholnom ekstrakcijom, digestijom, maceracijom ili destilacijom različitih dijelova bilja, citrus-plodova, začina, plodova kontinentalnog i južnog voća te raznih trava. Biljni ekstrakti također sadrže i organske kiseline, bojila, mineralne tvari i ostalo. U njihovom sastavu moguće je pronaći i aromatične biljne ekstrakte te šećere. Prilikom proizvodnje određenih pića od biljnih ekstrakata, dopušteno je koristiti i kininov hidroklorid, kofein i ortofosforu kiselinu te navesti njihove količine, kao i količine suhe tvari i ugljikovog dioksida.<sup>20</sup>

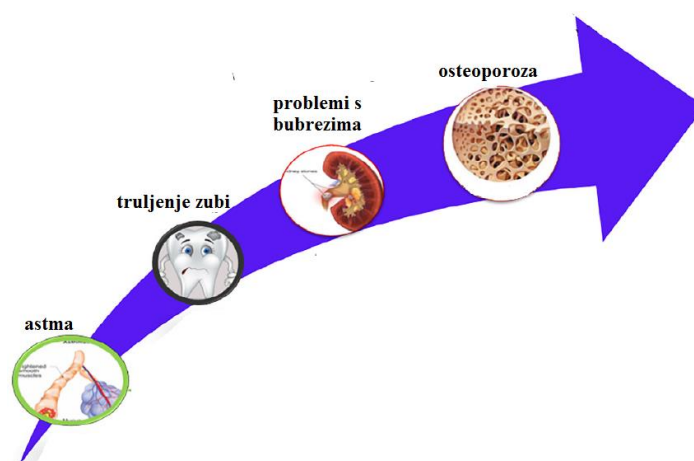
Prema navedenom Pravilniku, osvježavajućim bezalkoholnim pićima od žitarica ili sirutke smatraju se mutni ili bistri proizvodi dobiveni od vode, žitarica ili proizvoda od žitarica, sirutke ili proizvoda od sirutke, šećera i/ili dopuštenih umjetnih sladila, s dodatkom ugljikovog dioksida i aditiva. Ukoliko se proizvod deklarira kao piće od sirutke, njezin udio mora iznositi najmanje 40%. Takvi proizvodi dobivaju se fermentacijom žitarica ili proizvoda od žitarica te od koncentriranih ekstrakata proizvoda od žitarice ili sirutke. Uz žitarice i sirutku, u takvim proizvodima mogu se naći i šećeri, pivski kvasac te hmelj i proizvodi od hmelja. Na tržištu se deklariraju kao osvježavajuća bezalkoholna pića od žitarica/sirutke i navodi količina suhe tvari i ugljikovog dioksida.<sup>20</sup>

Umjetna osvježavajuća bezalkoholna pića su dobivena od vode ili mineralne vode, šećera i/ili umjetnih sladila, aroma, s dodatkom ili bez dodatka ugljikovog dioksida i aditiva. Uz šećere, dodati im se mogu i vitamini i minerali u količinama od 15% od preporučene dnevne količine. Deklaracija ovih proizvoda mora sadržavati informacije o količini suhe tvari i ugljikovog dioksida.<sup>20</sup>

Sve navedene vrste osvježavajućih bezalkoholnih pića mogu se plasirati na tržište i kao pića sa sniženom energetska vrijednošću. Ukoliko je energetska vrijednost niža za najmanje 30% od propisane minimalne energetske vrijednosti, ovi proizvodi mogu se deklarirati kao „dijetetski” i imati oznaku niskoenergetskog, lakog, odnosno *light* proizvoda.<sup>20</sup>

#### 2.4. Štetni učinci konzervansa na ljudsko zdravlje

U današnje vrijeme provode se brojne analize vezane za provjeru sigurnosti kemijskih konzervansa koji se koriste u svakodnevnoj prehrani diljem svijeta. Za neke od njih smatra se kako mogu imati toksične, kancerogene ili teratogene učinke na organizam. Kako je sve više spoznaja o štetnim učincima konzervansa (slika 5), počinje se sve više obraćati pozornost na to što određeni proizvodi sadržavaju te se sve više koriste prirodni konzervansi. Kombinacijom određenih prehranbenih aditiva može doći do nastajanja neželjenih, toksičnih tvari.<sup>5</sup>



Slika 5. Utjecaj konzervansa iz pića na ljudsko zdravlje.<sup>21</sup>

(ilustracija preuzeta i prilagođena prema V. N. Kalpana, V. D. Rajeswari, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, Vol. 1, Academic Press, Massachusetts, 2019, str.1-30.)

### 2.4.1. Štetni učinci benzojeve kiseline i njenih soli

Benzojeva kiselina i njezine soli općenito su prepoznate kao sigurni (engl. *Generally recognized as safe*, GRAS) spojevi koji su stoga odobreni od strane međunarodne zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) i organizacije za hranu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) za upotrebu u prehrambenim namirnicama, kozmetici, higijenskim proizvodima, iako su njihova toksičnost te razina sigurnosti sporni. U organizmu se brzo metaboliziraju i izlučuju mokraćom unutar 24 sata. Njihova apsorpcija moguća je putem gastrointestinalnog trakta, a unutar 1-2 sata dosegnu svoju maksimalnu koncentraciju u krvnoj plazmi. Apsorpcija je također moguća djelomično kroz kožu te udisanjem.<sup>22</sup>

Benzojevoj kiselini se u jetri i bubrezima smanjuje toksičnost konjugacijom s glicinom u matriksu mitohondrija ili u manjoj mjeri s glukuronskom kiselinom u endoplazmatskom retikulumu te se kao konačni spoj izluči urinom kao hipurna kiselina i benzoil-glukuronid. Pri lokalnoj primjeni, kiselina može uzrokovati urtikariju i eritem izlaganjem kože velikim količinama prostaglandina D2. Prehrana bez benzojeve kiseline i njezinih soli preporučuje se ljudima koji boluju od kroničnih upalnih bolesti. Pojedini slučajevi astme, urtikarije, rinitisa, osipa pa i anafilaktičkog šoka zabilježeni su pri oralnom, dermalnom ili inhalacijskom izlaganju čak i pri količinama manjim od ADI (0-5 mg/kg/tm), dok natrijev benzoat može izazvati kronični svrbež. Kod nekih ljudi benzojeva kiselina može utjecati i na sluznicu probavnog sustava, a pri udjelima većim od ADI može izazvati iritaciju jednjaka, glavobolju, mučninu te inhibirati probavne enzime poput pepsina, tripsina, polipeptidaze i D-aminokiselinske oksidaze. Ostali simptomi, koji se mogu povezati sa smanjenjem količine glicina zbog njegove upotrebe u smanjenju toksičnosti benzojeve kiseline, su proljev, slabost mišića, metabolička acidoza, konvulzije, drhtavica, hipoaktivnost i iscrpljenost. Također, kod djece može doći do pojave hiperaktivnosti ili hiperkinetskog poremećaja.<sup>22</sup>

Istraživanjima *in vitro* na crvenim krvnim stanicama dokazano je kako dodatak natrijevog benzoata smanjuje aktivnost enzima poput aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze i alkalne fosfataze. U limfocitima periferne krvi, benzojeva kiselina i njezine soli pokazale su genotoksične učinke uključujući kromosomske aberacije, izmjenu sestrinskih kromatida, oštećenja mikrojezgre te DNA i redukciju mitotičkog indeksa. Kod mononuklearnih stanica, natrijev benzoat smanjuje Th1-tip odgovora te  $\gamma$ -aktivnost interferona i time povećava šansu za pojavu imunosupresije, odgovor organizma na patogene i

tumore više nije toliko učinkovit te su moguće i alergijske bolesti. Čak i doza od 0,1% natrijevog benzoata u ljudskim klonalnim epitelnim stanicama može izazvati oksidativni stres te staničnu smrt.<sup>22</sup>

Navedeni učinci benzojeve kiseline i njezinih soli prisutnih u hrani, lijekovima i kozmetici svrstavaju se u direktne učinke. Uz direktne učinke, važno je uočiti i indirektne pojave koje nastaju razgradnjom i/ili biokemijskim reakcijama te stvaranjem novih toksičnih spojeva. U prisutnosti askorbinske kiseline u nekim pićima, benzojeva kiselina i njezine soli mogu dekarboksilirati te otpustiti male količine benzena. Upravo nastali benzen klasificiran je u grupu 1 kancerogenih spojeva. Za njegovu količinu u pićima ne postoje trenutno nikakvi standardi, osim za vodu u kojoj ga smije biti najviše 5 µg/kg prema preporukama FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Prema istraživanjima provedenim od strane FDA na 86 bezalkoholnih pića, pronađeni udjeli benzena bili su većinom ispod detekcijskih granica pa do udjela od 88,9 µg/kg. Još uvijek nisu završena istraživanja koja pokušavaju u potpunosti razjasniti vezu između benzena i prisutnosti benzojeve i askorbinske kiseline i faktora koji utječu na njegovo nastajanje poput  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  iona, pH i UV zračenja.<sup>22</sup>

#### 2.4.2. Štetni učinci sorbinske kiseline i njenih soli

Sorbinska kiselina podvrgnuta je nizu testiranja u svrhu određivanja toksičnosti i kancerogenosti unatoč tome što se prirodno nalazi u tijelu i činjenici da se metabolizira kao i svaka druga masna kiselina kratkog lanca. Kiselina ima nisku akutnu oralnu toksičnost, a letalna doza za odraslog čovjeka je oko 500 g/kg. Testovi kratkotrajne toksičnosti provedeni su na miševima, štakorima te psima, a uočeni simptomi su manja povećanja kilograma i težine jetre. Nisu uočene nikakve teške abnormalnosti ili histološke promjene u tkivima. Štetni učinci nisu uočeni niti u reproduktivnom sustavu ili postporođajnom razvoju. Testiranjem na štakorima također je uočeno kako sorbinska kiselina ima vrlo nisku kroničnu toksičnost te ne potiče stvaranje tumora. Pri bilo kojem postotku sorbinske kiseline, nisu uočene razlike u hematološkim parametrima, nivou enzima u serumu, radu bubrega ili histološkim nalazima.<sup>23</sup>

Ipak, zabilježen je niz slučajeva netolerancije na sorbinsku kiselinu i njene soli u ljudi, ali ne postoje primjerene baze podataka pomoću kojih bi se mogla utvrditi učestalost tih pojava u različitim populacijama. Pojedine osobe mogu upotrebom sorbinske kiseline razviti urtikariju, a posebno osobe koje su općenito osjetljive na mliječnu kiselinu. 90% bolesnika koji su sudjelovali u istraživanju reagiralo je na neki prehrambeni aditiv, poput sorbinske

kiseline, benzoata, tartrazina te razvili kroničnu urtikariju. Sorbinska kiselina povezuje se i s pseudoalergijama te sindromom nazvanim „sindrom pečenja usta”, a izlaganjem sorbinskoj kiselini putem hrane i pića moguće je razviti i „sindrom iritabilnog crijeva”.<sup>23</sup>

Sorbinska kiselina upotrebljava se u nekim slučajevima kao sredstvo za stvrdnjavanje i zamjena za nitrite te djeluje inhibirajuće na rast bakterije *Clostridium botulinum* i smanjuje stvaranje nitrozamina. Usprkos tome, reagira li sorbinska kiselina s nitritom može doći do pojave toksikoloških problema, tj. nastanka mutagenih produkata te reakcije poput 1,4-dinitro-2-metil pirola.<sup>23</sup>

#### 2.4.3. Štetni učinci ostalih konzervansa

Nitrati se koriste za konzerviranje hrane, najčešće mesnih proizvoda, a nakon što se unesu u organizam prelaze u nitrite. Nitriti u tijelu reagiraju s hemoglobinom te stvaraju methemoglobin koji dovodi do gušenja, gubitka svijesti pa i smrti, pogotovo u dojenačkoj dobi. Kada nitriti reagiraju s proteinima u želudcu, dolazi do nastanka kancerogenih spojeva, poput nitrozamina. Povećan udio nitrata u hrani može uzrokovati veću smrtnost od dijabetesa tipa 2, Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti. Prehrambeni konzervansi koji sadrže sulfite mogu uzrokovati pogoršanje astme ili pojavu alergijskih reakcija. Trudnice koje koriste kozmetičke proizvode koji sadrže paraben i metilizotiazolinon, izlažu se velikom riziku nepravilnog razvoja mozga fetusa. Diazolidinil-urea, formaldehid, DMDM, hidantoin i imidazoildinil-urea kao sastojci kozmetičkih proizvoda mogu izazvati nadražaj očiju, kože i pluća, a ukoliko je izloženost duža, može doći i do oštećenja DNA spermija. Prehrambeni aditivi koji se koriste u većini dječje hrane i pića uzrokuju i različite poremećaje ponašanja.<sup>5</sup>

## 2.5. Analitičke metode određivanja prehrambenih aditiva

Svakodnevno korištenje prehrambenih aditiva diljem svijeta zahtijeva strogu provjeru sigurnosti prehrambenih namirnica kako bi se izbjegli neželjeni učinci na ljudsko zdravlje. Svaka država ima svoj vlastiti zakon prema kojem se kontrolira proizvodnja te provodi identifikacija i kvantifikacija aditiva. Analitičkim metodama određuju se aditivi u sirovinama, neovisnim sastojcima, prerađenim proizvodima, međuproduktima tijekom proizvodnog procesa te u konačnim proizvodima. Nužno je da primjenjene metode pružaju određenu pouzdanost, osjetljivost, selektivnost, brzinu, da su sigurne, ekološki prihvatljive, a ujedno i

što je moguće više povoljne. Neovisno o izboru metode, potrebno je razraditi postupak uzorkovanja, obrade uzorka prije analize te način interpretacije dobivenih rezultata. Način uzorkovanja ovisi o veličini uzorka, troškovima, raznolikosti sastavnica uzorka.<sup>24</sup> Određene vrste spojeva mogu utjecati na analizu te je stoga potrebno izabrati pogodnu metodu pripreve uzorka koja će smanjiti interferencije, biti brza, jednostavna, jeftina te ekološki prihvatljiva. Kako bi se dokazalo da je odabrana metoda pogodna za identifikaciju i kvantifikaciju određenog aditiva u složenim uzorcima i u odgovarajućem rasponu koncentracija, bitnim parametrima smatraju se linearnost, točnost, osjetljivost metode, preciznost, koncentracijski raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije te robusnost.<sup>25</sup>

Na raspolaganju je veliki broj analitičkih metoda (spektroskopskih, kromatografskih, elektroanalitičkih) analize prehrambenih aditiva, a izbor ovisi o svojstvima samoga uzorka (krutina, tekućina ili plin), o očekivanom udjelu aditiva, iskustvu analitičara, dostupnoj opremi i reagensima, vremenu analize, broju uzoraka koje je potrebno analizirati i o količini interferirajućih tvari prisutnih u uzorku. Najviše objavljenih znanstvenih radova povezano je s analizom aditiva koji kod potrošača izazivaju zdravstvene probleme ili nepoželjan okus namirnica kao što su regulatori kiselosti, boje, antioksidansi i konzervansi.<sup>24</sup>

### 2.5.1. Kromatografske tehnike

Kromatografske tehnike čine skup analitičkih metoda koje odvajaju, identificiraju te kvantificiraju organske i anorganske spojeve načelom odjeljivanja uzoraka između pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne) faze. Odjeljivanje se zasniva na uspostavi ravnoteža između analiziranih tvari i mobilne faze (plinovita, tekuća) te stacionarne faze (čvrsta, tekuća). Ove tehnike dijele se prema fizikalno-kemijskim načelima odjeljivanja. Kod adsorpcijske kromatografije, stacionarnu fazu čini kruta tvar na koju se adsorbiraju komponente uzorka. Kromatografija ionske izmjene koristi kao stacionarnu fazu podlogu za izmjenu iona, dok se kod kromatografije isključenjem molekule razdvajaju na temelju veličine ovisno o njihovom prodiranju u stacionarnu fazu. Najčešće korištene kromatografske tehnike za aditive su plinska (engl. *Gas chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija (engl. *Liquid chromatography*, LC).<sup>24</sup>

Unatoč brojnim prednostima plinske kromatografije, oko 80% spojeva nije dovoljno stabilno ili hlapljivo da bi se odvojilo ovom tehnikom. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) koristi se u većini

analitičkih postupaka za određivanje aditiva. Obje tehnike koriste se radi poboljšanja odvajanja i identifikacije velikog broja različitih organskih i anorganskih spojeva. Pri analizi tekućinskom kromatografijom važan je izbor odgovarajuće mobilne faze, a koriste se različita organska otapala, njihove smjese ili otopine pufera. Mobilna faza kod klasične tekućinske kromatografije (LC) protječe kroz kolonu pri atmosferskom tlaku uz pomoć pumpe ili pomoću gravitacije, a kod tehnike HPLC pri povišenom tlaku.<sup>24</sup>

Uređaj za HPLC sastoji se od pumpe, injektora, kolone za odjeljivanje, detektora te sustava za obradu podataka. Kao mobilna faza (eluens) koriste se organska otapala visoke čistoće ili puferske otopine koje odvajaju komponente na temelju njihovih različitih afiniteta prema mobilnoj i stacionarnoj fazi. Eluiranje može biti izokratno, tako da je sastav mobilne faze stalan tijekom cijele analize te gradijentno, pri čemu se sastav mobilne faze mijenja. Pumpe u većini uređaja mogu miješati i do četiri različita eluensa. Uzorak se pomoću injektora unosi u mobilnu fazu, a najčešće se kao injektori koriste autosampleri za veliki broj uzoraka. Odabrana kolona određuje vrstu kromatografije. Pri kromatografiji normalnih faza stacionarna faza je polarna, a mobilna faza nepolarna, dok je kod kromatografije obrnutih faza mobilna faza (acetonitril, metanol) polarnija od stacionarne faze.<sup>26</sup>

Kolone za HPLC ispunjene su česticama silikagela visoke čistoće promjera manjeg od 2 µm kako bi se postigao visoki tlak te manji gubitci pri velikim protocima, omogućujući tako brzo odvajanje. Silanolne skupine prisutne u česticama silikagela predstavljaju mjesto polarne interakcije te mogu mijenjati polaritet stacionarne faze prema polaritetu spoja koji treba odvojiti. Tijekom analize hrane tehnikom HPLC, detektori pretvaraju tok koji sadrži mobilnu fazu i analizirani spoj u električni signal proporcionalan koncentraciji analita. Najčešće se koristi UV/Vis apsorpcijski detektor koji mjeri apsorpciju zračenja spojeva koji sadrže kromofore, a fluorescencijski detektor mjeri emitiranu svjetlost.<sup>26</sup>

Glavne prednosti tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti su njezina učinkovitost, visoka osjetljivost, veliki izbor stacionarnih faza. Preveliki troškovi instrumentacije, toksični otpad koji ostaje nakon uporabe organskih otapala te školovano osoblje glavni su nedostaci ove metode.<sup>26</sup>



## 2.6. Validacija analitičke metode

Validacija odgovarajuće analitičke metode može se definirati na više načina. Najčešća definicija validacije je postupak dokazivanja kako je određena analitička metoda prikladna za svrhu kojoj je namijenjena, tj. da je pomoću nje moguće riješiti odgovarajući analitički problem. Validacijom metode dobiva se uvid u kvalitetu samog uzorka pridružujući uzorcima vrijednosti rezultata koje su što bliže stvarnim vrijednostima. Kako bi institucije odgovorne za zaštitu zdravlja i okoliša diljem svijeta mogle uspješno izvršavati zadatke, potrebno je da raspolazu provjerenim podacima koji se dobivaju ukoliko svi poštuju ista načela i pravila. Primjenom osiguranja kvalitete, u analitičkim laboratorijima osigurava se poštivanje principa dobrih praksi i zakonskih normi. Osiguravanje kvalitete obuhvaća dva područja, kontrolu kvalitete te ocjenu kvalitete. Verificira se akreditacijom, gdje laboratorij traži od odgovarajuće institucije da ga pregleda i potvrdi da je sposoban za provedbu određenih analitičkih postupaka. Drugi način verifikacije sustava osiguranja kvalitete je dobra laboratorijska praksa gdje laboratorij sam provodi kvalitetu i ocjenu svoga rada. Tijekom validacije metode definiraju se validacijski parametri, granice prihvatljivosti i učestalost ispitivanja prikladnosti sustava. Metodu je potrebno validirati prije uporabe, kada se promijene određeni eksperimentalni uvjeti i kada se sami po sebi promijene parametri provedbe metode. Validacije se provode na različite načine, ali postoje opće usvojene smjernice što se treba napraviti. Zahtjevi validacije se mijenjaju kako se uvode sve novije i bolje analitičke tehnike uz sve strože regulacije. Postupak validacije sastoji se od tri osnovna koraka: definicija problema i planiranje rada, mjerenje i obrada podataka te izrada dokumentacije.<sup>27</sup>

Važni parametri validacije analitičke metode su specifičnost, selektivnost, preciznost, ponovljivost, intermedijarna preciznost, reproducibilnost, točnost, linearnost, područje, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost.<sup>27</sup>

Specifičnost, odnosno selektivnost, dva su zasebna pojma koja se često miješaju. Specifičnom metodom smatra se određivanje samo jednoga jedinog analita, dok se selektivnom metodom smatra metoda koja može odrediti više komponenata istovremeno, bile one iste ili različite. Ovaj validacijski parametar važan je pri identifikacijskim ispitivanjima, određivanju nečistoća i određivanju sadržaja. Selektivnost se definira kao mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti komponenti koje se mogu očekivati u matriksu uzorka. Drugi bitan parametar je preciznost. Preciznost opisuje slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pri propisanim uvjetima i zadanom

preciznošću. Određuje se tako da se napravi 5-6 mjerenja homogenog autentičnog uzorka pri 2-3 različite koncentracije. Preciznost je moguće izraziti pomoću standardnog odstupanja, relativnog standardnog odstupanja te rasponom pouzdanosti srednje vrijednosti. Granice prihvatljivosti relativnog standardnog odstupanja su u prehrambenim uzorcima 2-20%. Preciznost se izražava na tri načina, preko ponovljivosti (repetibilnosti), intermedijarne preciznosti i obnovljivosti ili reproducibilnosti. Definicija točnosti je stupanj podudaranja između stvarne, to jest prihvaćene referencijske vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primjenjenim analitičkim postupkom određeni broj puta. Točnost se određuje nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Linearnost je mogućnost metode da, unutar zadanog područja, daje ispitne rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se pomoću kalibracijskih grafova za analit u širokom rasponu koncentracija te se odaberu linearna područja.

Područje kao parametar, izražava se u istim jedinicama kao i rezultati metode te predstavlja raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita, uključujući i granice, u uzorku koje se mogu kvantificirati uz odgovarajuću preciznost, točnost i linearnost. Granicom detekcije smatra se najmanja količina analita u uzorku koju je moguće detektirati, odnosno točka gdje je mjerena vrijednost veća od nesigurnosti kojom se mjeri. Granicu detekcije moguće je procijeniti vizualno ili pomoću omjera signala i šuma i standardnog odstupanja. Za razliku od granice detekcije, granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Ukoliko dođe do malih, namjernih promjena parametara metode, otpornost analitičkog postupka na te promjene naziva se robusnost. Njome se određuje utjecaj radnih parametara na same rezultate analize. Podatci koji se dobiju pomoću robusnosti govore o tome je li metodu potrebno revalidirati prilikom promjene jednog ili više parametara. Za analizu tehnikom HPLC važno je ispitati utjecaj sastava i pH vrijednosti mobilne faze, različitih kolona, temperature i protoka. Stabilnost otopine uobičajen je parametar ispitivanja robusnosti.<sup>27</sup>

## 2.7. Javno mišljenje o prehrambenim aditivima

Toksikološke informacije dobivene raznim ispitivanjima kemijskih tvari glavno su uporište pri donošenju zaključaka o mogućim rizicima i opasnostima koje idu uz konzumiranje raznih proizvoda. Kada su rizici poznati, može se odlučiti hoće li se određeni proizvod naći na tržištu te hoće li ih sami potrošači prepoznati kao bezopasne te konzumirati. Novi uvidi u toksikologiju pomažu pri identifikaciji novih potencijalno štetnih tvari, pri ponovnoj procjeni normi izloženosti ili pri opovrgavanju starih ideja o riziku konzumiranja neke tvari.<sup>28</sup>

Veliki problem nastaje kada šira javnost ne razumije u potpunosti činjenice o mogućim rizicima koje je iznijela znanstvena zajednica. Na taj način laici mogu koristiti vrijednosti, uvjerenja i stavove vezane za poznate rizike pri tumačenju nepoznatih podataka zbog pojedinih sličnosti. Na procjenu rizika utječe međusobna povezanost kognitivnih i afektivnih spoznaja. Kada su rizici nepoznati, ljudima nedostaju uvjerenja na kojima bi mogli temeljiti svoje procjene. Također, kada ljudi nisu upoznati s opasnostima, oslanjaju se na povjerenje u tijela koja su zaslužna za procjene rizika. Na temelju nedovoljnog poznavanja rizika koje mogu izazvati nepoznate kemikalije u hrani, ljudi lako stvore stajališta i subjektivne procjene o kemikalijama općenito.<sup>28</sup>

Štetni učinci kemikalija uvelike ovise o njihovoj otrovnosti i izloženosti, a istraživanja su pokazala kako je značajan dio javnosti neosjetljiv prema načelu toksičnosti. Što se tiče kancerogenosti, više od polovice ispitanika smatra kako je već i sama izloženost štetnim tvarima dovoljna da bi se razvio tumor što predstavlja popriličnu zabrinutost kod istraživača. Problem je u tome što javnost ne razlikuje u dovoljnoj mjeri toksikološke opasnosti od rizika. Kako je stav populacije prema kemikalijama općenito negativan, dolazi do toga da se nepoznate kemijske supstance u hrani automatski smatraju štetnima.<sup>28</sup>

Kada se radi o uvjerenjima i stavovima javnosti o prehrambenim aditivima u hrani, nedostatak prethodnog znanja vodi do toga da se novi ili nepoznati rizici vrednuju prema vrijednostima vezanima za hranu. Nedavna anketa Europske agencije za sigurnost hrane pokazala je kako je Europljanima sigurnost hrane na prvom mjestu pri kupovanju namirnica. Anketa je također pokazala kako ljudi, čak i kada rizik ne postoji, posežu za prirodnim proizvodima te stvaraju odbojnost prema hrani koja sadrži umjetne aditive. Iako im manjka znanja o rizicima i regulaciji prehrambenih aditiva, i dalje mogu zadržati vjerovanja o regulaciji sigurnosti hrane ili o sigurnosti kemikalija koje se u hrani upotrebljavaju.

Nepovoljni stavovi o kemikalijama općenito te uz to i o prehrambenim aditivima i (plastičnim) ambalažama mogu utjecati na ocjenu novih kemijskih tvari u hrani.<sup>28</sup>

Konkretno govore kako 90% ispitanika smatra da je izlaganje štetnim sastojcima hrane to koje će utjecati na to hoće li se pojaviti štetni učinci. 44% ispitanika misli kako ne postoje sigurne količine štetnih tvari, a 62% se ne slaže da kemikalije mogu izazvati bolesti ukoliko je izloženost ispod sigurnosne razine.<sup>28</sup>

Kako ispitanici prethodno nisu imali znanja i uvjerenja o kemijskim tvarima prisutnim u hrani, njihove procjene većinom su bile rezultat pruženih informacija od strane stručnjaka. U društvu su se tako pojavila tri glavna elementa javne procjene koji mogu imati posljedice na priopćavanje rizika. Prvo, uočeno je kako razlike u procjeni ozbiljnosti prisutnosti tvari u hrani te opseg rizika sugeriraju da javnost razlikuje opasnost i procjenu rizika. Rezultati su također pokazali kako velika većina ispitanika vjeruje da je upravo izloženost ta koja će odrediti je li neka tvar rizik za zdravlje. Isto tako, značajniji dio javnosti smatra da su sve tvari prisutne u prehrambenim namirnicama podjednako štetne. Treći element javne procjene je korelacija između vrijednosti vezanih za sigurnost hrane i ishod ocjenjivanja te prihvaćanja znanstvene neizvjesnosti i rezultata procjene. Sve navedeno upućuje na postojanje neusklađenosti između očekivane neizvjesnosti i stvarne neizvjesnosti o sigurnosti hrane.<sup>28</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

#### 3.1.1. Kemikalije

- 1) standardi: natrijev benzoat,  $\omega = 99,3\%$  i LGC *Standards* kalijev sorbat,  $\omega = 99,8\%$ ; *Dr. Ehrenstorfer GmbH*
- 2) ultračista voda električne provodljivosti  $0,055 \mu\text{S}$
- 3) natrijev acetat, p.a. čistoće; *Kemika d.d.*
- 4) metanol za HPLC,  $\varphi = 99,9\%$ ; *PanReacAppliChem*

#### 3.1.2. Korišteni instrumenti

- 1) kromatograf HPLC *Agilent Technologies Serie 1200*
- 2) kromatografska kolona: *ChromClone C18, 150x4,6mm; Phenomenex*
- 3) ultrazvučna kupelj
- 4) dispencer *Dispensette Organic; Brand*

#### 3.1.3. Uvjeti rada kromatografa

- 1) mobilna faza - acetatni pufer : metanol (65 : 35 v/v)
- 2) protok mobilne faze: 1 mL/min
- 3) temperatura rada: 40 °C
- 4) detektor – UV – valna duljina 240 nm
- 5) volumen analiziranog uzorka – 20  $\mu\text{L}$
- 6) kolona: C<sub>18</sub>, 150 x 4,5 mm, 5  $\mu\text{m}$
- 7) vrijeme eluiranja: 15 min

### 3.1.4. Priprema mobilne faze

#### ACETATNI PUFER:

U odmjernu tikvicu od 1000 mL odvaže se 1,64 g natrijevog acetata i otopi u oko 950 mL redestilirane vode.

Kiselost se podesi na pH=4,0 dodatkom octene kiseline te se zatim tikvicu do oznake nadopuni vodom.

U menzuru od 1000 mL ulije se 650 mL acetatnog pufera pH=4,0 i 350 mL metanola.

### 3.1.5. Priprema uzorka

Uzorci namijenjeni analizi tehnikom HPLC pripremaju se tako da se otpipetira 5 mL odabranog osvježavajućeg bezalkoholnog pića u odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopuni ultračistom vodom električne provodljivosti 0,055  $\mu$ S. Prilikom nadopune korišten je uređaj *dispenser* radi olakšanja samoga postupka, ali nadopuna se može izvršiti i na uobičajeni način, pomoću boce štrcaljke. Nakon dodatka vode, odmjernu tikvicu potrebno je nekoliko puta preokrenuti kako bi se sadržaj izmiješao. Gazirana pića se prije samoga pipetiranja moraju degazirati na ultrazvučnoj kupelji u trajanju od 5 minuta. Ukoliko se i nakon 5 minuta uoče mjehurići, postupak se ponovi. Nakon što je uzorak pripremljen, potrebno je profiltrirati ga u bočice za uzorkivač koje sadrže filtere s veličinom pora 0,45  $\mu$ m. Ukoliko uzorak sadrži veću količinu neotopljenih čestica, prvo se centrifugira, a zatim za daljnu pripremu koristi dobiveni supernatant. Također je potrebno na isti način profiltrirati i mobilnu fazu, to jest sve sastavnice koje se unose u uređaj kako ne bi došlo do začepjenja kolone. Bočica s uzorkom se zatim zamrzne ukoliko se neće odmah provoditi analiza. Kako bi se izbjeglo pucanje bočice pri smrzavanju, zbog povećanja volumena tekućine, bočice se nikada ne pune do vrha.

### 3.1.6. Tijek metode

Za određivanje koncentracije soli benzojeve kiseline i soli sorbinske kiseline u osvježavajućim bezalkoholnim pićima korištena je tehnika tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (slika 6).

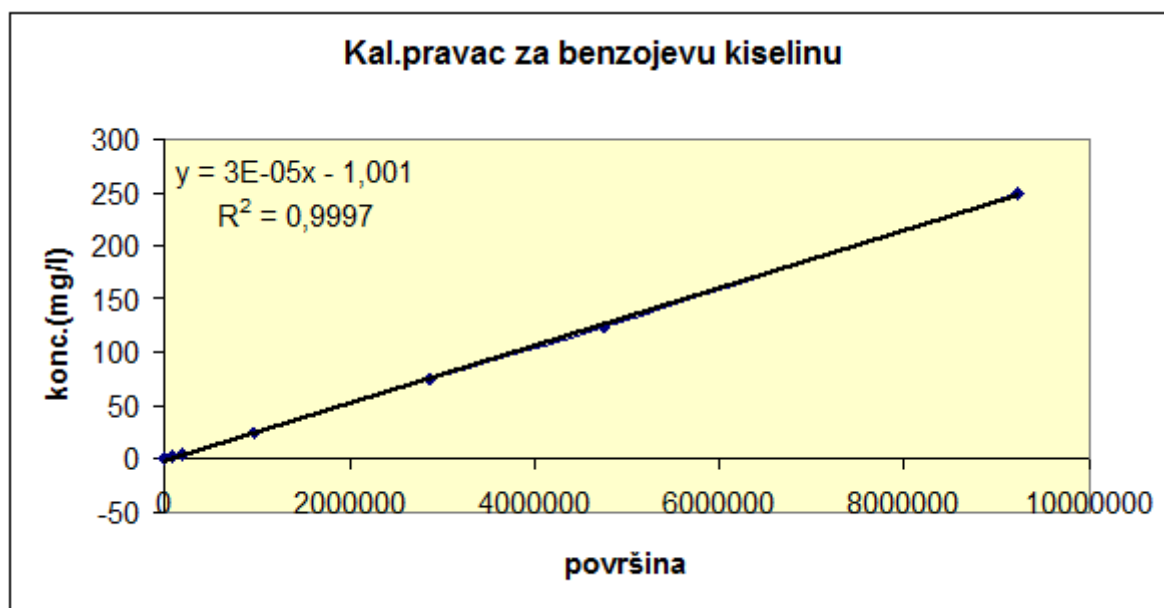


Slika 6. HPLC uređaj.

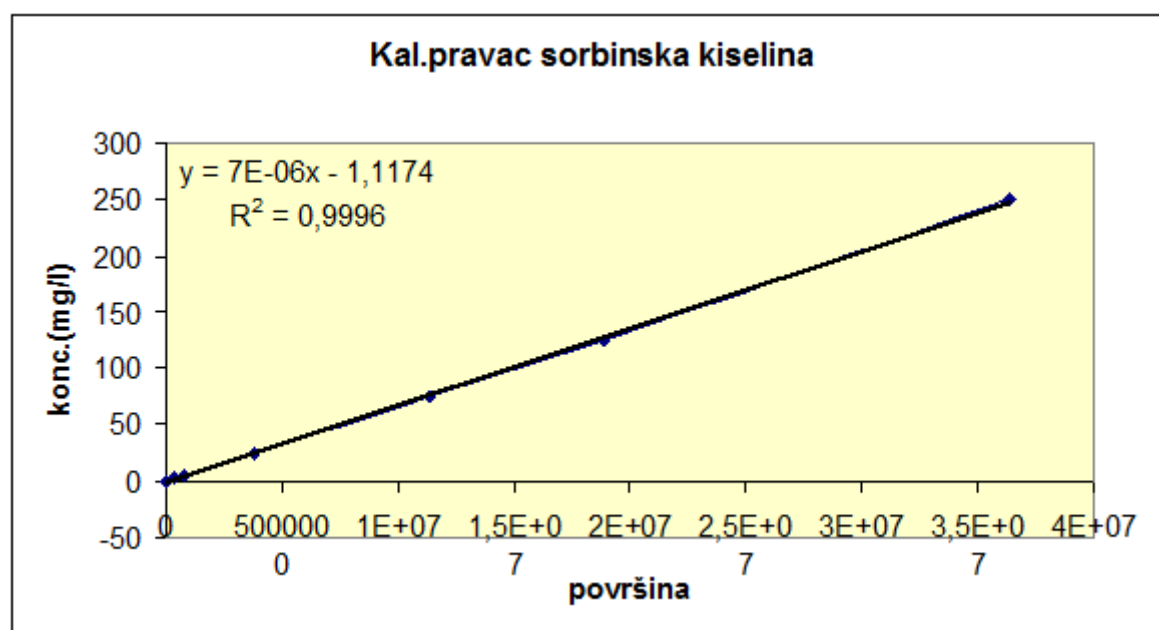
Korištena je izokratna metoda u kojoj se sastav mobilne faze, koju čine natrijev acetat i metanol, nije mijenjao tijekom analize. Prije injektiranja samih uzoraka, potrebno je izmjeriti čiste standarde pomoću kojih se određuju retencijska vremena analizirane komponente uzorka te radni standardi (osvježavajuća bezalkoholna pića s poznatom koncentracijom benzojeve i sorbinske kiseline) kako bi se njihovi kromatogrami mogli usporediti s kromatogramima uzoraka. Nakon što je uzorak pripremljen i profiltriran u bočicu za uzorkivač, bočica se stavi u uređaj te se pomoću autosamplera injektira 20  $\mu\text{L}$  uzorka. Unesena količina uzorka prolazi zajedno s otapalom kroz kolonu ispunjenu silikagelom na koji su kovalentno vezani ligandi  $\text{C}_{18}$ . Odjeljivanje analita temelji se na različitom vezanju analita na stacionarnu fazu. Odjeljene komponente s kolone stižu na UV detektor u različitim retencijskim vremenima. Kako bi se izračunala koncentracija željene komponente u određenom uzorku, mjeri se površina signala ispod pojedinog retencijskog vremena. Prisutnost traženih konzervansa u otopini uzorka utvrđuje se usporedbom retencijskih vremena analita koji se nalaze u uzorku sa standardima.

### 3.1.7. Kalibracija

Količine traženih analita u uzorku utvrđuju se metodom vanjskog standarda pomoću kalibracijskog pravca. Da bi se pripremio kalibracijski pravac (slike 7 i 8), potrebno je odrediti površinu pikova za minimalno 5 različitih koncentracija benzojeve i sorbinske kiseline.



Slika 7. Kalibracijski pravac benzojeve kiseline.



Slika 8. Kalibracijski pravac sorbinske kiseline.



### 3.1.8. Identifikacija

Prisutnost konzervansa utvrđuje se usporedbom njegovog retencijskog vremena signala s retencijskim vremenom signala standarda i certificiranog referentnog materijala.

### 3.1.9. Kvantifikacija

Količina prisutnog konzervansa izračuna se prema kalibracijskom pravcu (odnos površine signala i masene koncentracije upotrebljenih otopina standarda).

Izražavanje rezultata:  $\gamma = \frac{m(\text{tvari})}{V} \longrightarrow m(\text{tvari}) = \gamma \times V$

$$\omega = \frac{m(\text{tvari})}{m(\text{smjese})}$$

$$\omega(\text{BA}; \text{SA}) = \frac{\gamma(\text{BA}; \text{SA}) \times V}{m}$$

$\omega(\text{BA}; \text{SA})$  = izračunati maseni udio ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

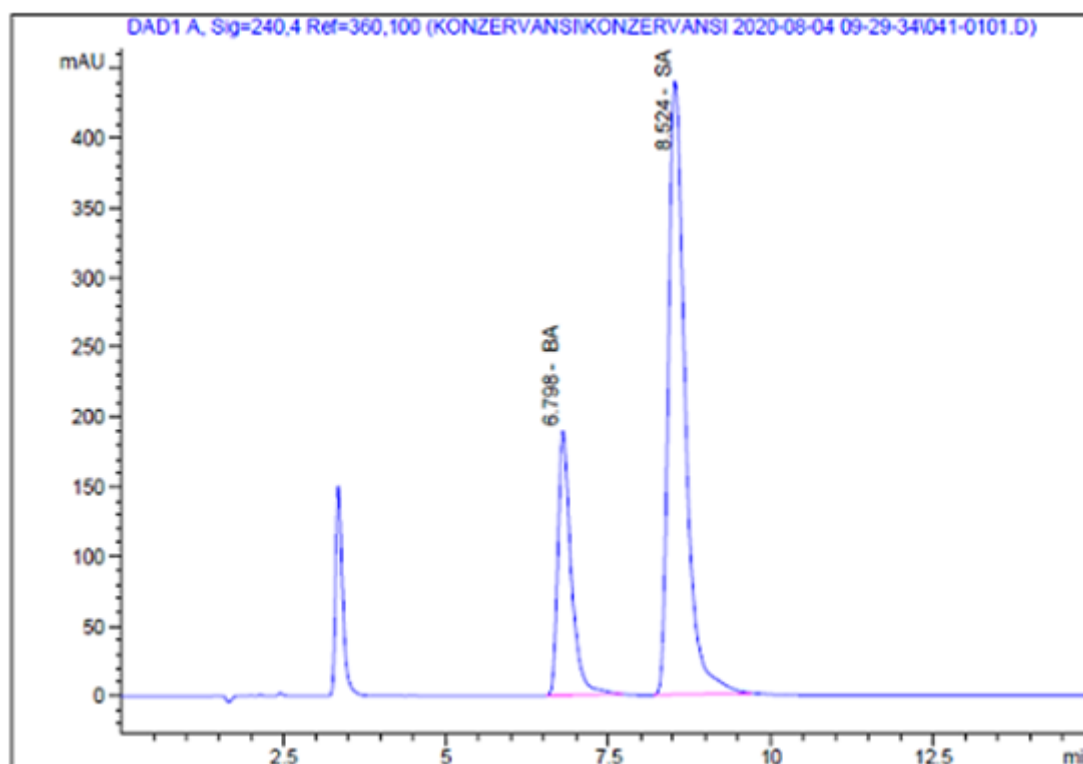
$\gamma(\text{BA}; \text{SA})$  = očitana masena koncentracija s kromatograma ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$V$  = volumen pripremljenog uzorka (L)

$m$  = odvaga uzorka (kg)

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

Koncentracija benzojeve i sorbinske kiseline u osvježavajućim bezalkoholnim pićima određena je pomoću kalibracijske krivulje, a dobiveno područje linearosti je 0,25 – 250 mg L<sup>-1</sup>. Količina pojedinog konzervansa u analiziranim uzorcima izračunata je na temelju signala prikazanih na kromatogramu (slika 9) pripremljenih smjesa standardnih otopina.



| ANALIT                  | RETENCIJSKO VRIJEME (min) | MASENA KONCENTRACIJA (mg/L) | POVRŠINA ISPOD PIKA |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------|
| benzojeva kiselina (BA) | 6,798                     | 56,467                      | 2,733e3             |
| sorbinska kiselina (SA) | 8,524                     | 59,715                      | 7,865e3             |

Slika 9. Prikaz kromatograma standardnih otopina benzojeve i sorbinske kiseline.

#### 4.1. Parametri validacije

Određeni su parametri validacije za određivanje benzojeve i sorbinske kiseline tehnikom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti: linearnost, iskorištenje, preciznost, odnosno ponovljivost te granica kvantifikacije čije su vrijednosti navedene u tablici 3.

Tablica 3. Sažeti prikaz vrijednosti izračunatih parametara validacije metode za određivanje benzojeve i sorbinske kiseline.

| Parametar                          | benzojeva, sorbinska     | Kriterij prihvatljivosti                   |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| Linearnost                         | k=0,9997, k=0,9996       | $k \geq 0,999$                             |
| Iskorištenje (srednje)             | 100%, 102%               | $100 \pm 10\%$                             |
| Preciznost:                        |                          |  |
| Ponovljivost pripreme uzorka (RSD) | 2,63%, 2,62%             | $RSD \leq 5\%$                             |
| ponovljivost mjerenja uzorka       | 1,68%, 1,43%             | $RSD \leq 5\%$                             |
| Granica kvantifikacije             | $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ | nije propisano; prema iskustvu analitičara |

Za analizu linearnosti odziva detektora priređene su  $\geq 4$  masene koncentracije standarda u području metode ( $0,25\text{-}250 \text{ mg L}^{-1}$ ) i unesene su u uređaj. Potom je određena jednadžba regresijskog pravca, nagib, odsječak i koeficijent korelacije.

Za izračunavanje iskorištenja (tablica 4) pripremljena su 4 uzorka s 4 različite masene koncentracije standarda.

Tablica 4. Prikaz izračunatih iskorištenja za određene masene koncentracije standarda.

|   | BENZOJEVA KISELINA | SORBINSKA KISELINA |
|---|--------------------|--------------------|
| uzorak / mg L <sup>-1</sup>                               | 12,068             | 10,281             |
|   | 12,060             | 10,276             |
|   | 12,055             | 10,272             |
| srednja vrijednost $\gamma$ (uzorka) / mg L <sup>-1</sup> | 12,061             | 10,276             |
| $\gamma$ (dodanog standarda) / mg L <sup>-1</sup>         | <b>6</b>           | <b>4</b>           |
| 1   | 17,667             | 14,245             |
|   | 17,670             | 14,241             |
|   | 17,657             | 14,234             |
| srednja vrijednost $\gamma$ (uzorka) / mg L <sup>-1</sup> | 17,665             | 14,240             |
| <b>iskorištenje</b>                                       | <b>93%</b>         | <b>99%</b>         |
| $\gamma$ (dodanog standarda) / mg L <sup>-1</sup>         | <b>11</b>          | <b>8</b>           |
| 2   | 23,351             | 18,243             |
|   | 23,349             | 18,229             |
|   | 23,369             | 18,239             |
| srednja vrijednost $\gamma$ (uzorka) / mg L <sup>-1</sup> | 23,356             | 18,237             |
| <b>iskorištenje</b>                                       | <b>101%</b>        | <b>105%</b>        |
| $\gamma$ (dodanog standarda) / mg L <sup>-1</sup>         | <b>28</b>          | <b>19</b>          |
| 3   | 40,332             | 30,177             |
|   | 40,333             | 30,136             |
|   | 40,665             | 30,129             |
| srednja vrijednost $\gamma$ (uzorka) / mg L <sup>-1</sup> | 40,443             | 30,147             |
| <b>iskorištenje</b>                                       | <b>101%</b>        | <b>105%</b>        |
| $\gamma$ (dodanog standarda) / mg L <sup>-1</sup>         | <b>55</b>          | <b>38</b>          |
| 4   | 68,871             | 49,884             |
|   | 68,881             | 49,875             |
|   | 68,896             | 49,885             |
| srednja vrijednost $\gamma$ (uzorka) / mg L <sup>-1</sup> | 68,883             | 49,881             |
| <b>iskorištenje</b>                                       | <b>103%</b>        | <b>104%</b>        |
| <b>srednja vrijednost iskorištenja</b>                    | <b>100%</b>        | <b>102%</b>        |

Preciznost postupka pripreme uzorka benzojeve i sorbinske kiseline određena je višestrukom pripremom uzorka i izražena kao RSD. Svaki uzorak ( $n \geq 5$ ) injektirao se 3 puta. Uzorci su prije injektiranja razrijeđeni 10 puta te je stoga bilo potrebno dobivenu konačnu masenu koncentraciju preračunati na 10 puta veću vrijednost. Iz dobivenih rezultata izračunata je srednja vrijednost i RSD (tablica 5).

Tablica 5. Preciznost postupka pripreme uzorka benzojeve i sorbinske kiseline, izražena kao RSD ( $n \geq 5$ ).

|   | Preciznost    |                          |                             |                       |
|---|---------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|
|   | uzorci        |                          | $\gamma / \text{mg L}^{-1}$ |                       |
| uzorak  | benzojeva     | sorbinska                | benzojeva<br>kiselina       | sorbinska<br>kiselina |
| <b>1</b>  | 12,232        | 10,244                   |                             |                       |
|   | 12,242        | 10,232                   |                             |                       |
|   | 12,211        | 10,248                   |                             |                       |
| srednja vrijednost<br>$\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | <b>12,228</b> | <b>10,241</b>            | 122,3                       | 102,4                 |
| <b>2</b>  | 11,778        | 9,885                    |                             |                       |
|   | 11,788        | 9,888                    |                             |                       |
|   | 11,785        | 9,866                    |                             |                       |
| srednja vrijednost<br>$\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | <b>11,784</b> | <b>9,880</b>             | 117,8                       | 98,8                  |
| <b>3</b>  | 12,622        | 10,522                   |                             |                       |
|   | 12,625        | 10,542                   |                             |                       |
|   | 12,642        | 10,555                   |                             |                       |
| srednja vrijednost<br>$\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | <b>12,630</b> | <b>10,540</b>            | 126,3                       | 105,4                 |
| <b>4</b>  | 12,523        | 10,467                   |                             |                       |
|   | 12,567        | 10,499                   |                             |                       |
|   | 12,212        | 10,489                   |                             |                       |
| srednja vrijednost<br>$\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | <b>12,434</b> | <b>10,485</b>            | 124,3                       | 104,9                 |
| <b>5</b>  | 12,453        | 10,452                   |                             |                       |
|   | 12,432        | 10,422                   |                             |                       |
|   | 12,444        | 10,433                   |                             |                       |
| srednja vrijednost<br>$\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | <b>12,443</b> | <b>10,436</b>            | 124,4                       | 104,4                 |
|   |               | srednja vrijednost       | 123,0                       | 102,7                 |
|   |               | standardno<br>odstupanje | 3,23                        | 2,68                  |
|   |               | <b>RSD</b>               | <b>2,63</b>                 | <b>2,62</b>           |

Preciznost mjerenja uzorka benzojeve i sorbinske kiseline određena je na temelju ponovljivosti. Za određivanje ponovljivosti postupka mjerenja ponovi se 10 unosa (injektiranja) uzorka iz istog standardnog uzorka benzojeve ili sorbinske kiseline (granica kvantifikacije-  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) uz zadane vrijednosti  $\text{RSD} < 5\%$  (tablica 6).

Tablica 6. Preciznost mjerenja uzorka benzojeve i sorbinske kiseline određena je na temelju ponovljivosti izražena kao  $\text{RSD}\%$ .

|                              | BENZOJEVA KISELINA        | SORBINSKA KISELINA |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|
| uzorci standardnih otopina   | $\gamma/\text{mg L}^{-1}$ |                    |
| 1                            | 0,251                     | 0,257              |
| 2                            | 0,247                     | 0,248              |
| 3                            | 0,248                     | 0,246              |
| 4                            | 0,252                     | 0,249              |
| 5                            | 0,254                     | 0,246              |
| 6                            | 0,256                     | 0,246              |
| 7                            | 0,248                     | 0,248              |
| 8                            | 0,252                     | 0,247              |
| 9                            | 0,241                     | 0,246              |
| 10                           | 0,250                     | 0,244              |
| <b>srednja vrijednost</b>    | <b>0,250</b>              | <b>0,248</b>       |
| <b>standardno odstupanje</b> | <b>0,00420</b>            | <b>0,00356</b>     |
| <b>RSD</b>                   | <b>1,681%</b>             | <b>1,438%</b>      |

Na temelju analize 25 različitih osvježavajućih bezalkoholnih pića iz dobivenih masenih koncentracija prisutnih konzervansa (benzojeve i sorbinske kiseline te njihovih soli), utvrđeno je kako niti jedno piće ne sadrži konzervanse u nedozvoljenim količinama (tablica 7).

Tablica 7. Masene koncentracije benzojeve i sorbinske kiseline u 25 bezalkoholnih osvježavajućih pića.

| UZORCI |                                   | $\gamma/ \text{mg L}^{-1}$ |                    |
|--------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|
|        |                                   | benzojeva kiselina         | sorbinska kiselina |
| 1      | Fanta Shokata                     | 0*                         | 156                |
| 2      | Fanta Mucho                       | 0                          | 197                |
| 3      | Fanta Orange Zero                 | 0                          | 146                |
| 4      | Schweppes PineappleBasil          | 0                          | 164                |
| 5      | Schweppes BitterLemon             | 0                          | 143                |
| 6      | Schweppes Tangerine               | 0                          | 108                |
| 7      | Schweppes Pink Grapefruit         | 0                          | 247                |
| 8      | Sprite Zero Cactus                | 111                        | 0                  |
| 9      | Pipi                              | 96,9                       | 0                  |
| 10     | Sky Orange                        | 88,6                       | 6,06               |
| 11     | Cockta                            | 85,8                       | 0                  |
| 12     | Party Orange                      | 83,3                       | 0                  |
| 13     | Inka                              | 106                        | 0                  |
| 14     | Nara                              | 0                          | 121                |
| 15     | Limona Mint                       | 0                          | 169                |
| 16     | Multi Sola                        | 115                        | 174                |
| 17     | Sensation Bazga Limun             | 120,28                     | 0                  |
| 18     | JuicyFruits Naranča-nektarina     | 126                        | 210                |
| 19     | JuicyFruits Multivitamin          | 124                        | 236                |
| 20     | JuicyFruits Crvena naranča-jabuka | 126                        | 182                |
| 21     | ProSport Superfruits              | 139                        | 153                |
| 22     | ProSport Limun-grejp              | 119                        | 64                 |
| 23     | ProSport Naranča                  | 119                        | 64,7               |
| 24     | Red Bull                          | 0                          | 0                  |
| 25     | Burn Energy                       | 145                        | 223                |

\*manje od granice kvantifikacije

Međunarodne prehrambene organizacije odredile su prihvatljivi dnevni unos pojedine tvari u osvježavajućim bezalkoholnim pićima koja ni pri svakodnevnoj upotrebi tijekom cijeloga života neće izazvati poteškoće. Prihvatljivi dnevni unos za benzojevu kiselinu je  $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , a za sorbinsku  $25 \text{ mg kg}^{-1}$ .<sup>4</sup> Najveća dopuštena masena koncentracija navedenih konzervansa u pićima je  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , a samo pojedini proizvodi sadrže ih u graničnim vrijednostima (Schweppes Pink Grapefruit i JuicyFruits Multivitamin). Najveći udjeli benzojeve kiseline ( $139 \text{ mg L}^{-1}$ ) pronađeni su u negaziranim i izotoničnim sportskim pićima na bazi voća (ProSport Superfruits, JuicyFruits Naranča-nektarina), dok su velike masene koncentracije sorbinske kiseline ( $247 \text{ mg L}^{-1}$ ) prisutne u negaziranim kako i u gaziranim pićima (Schweppes Pink Grapefruit i JuicyFruits Multivitamin). Masena koncentracija konzervansa u dva ispitana energetska pića sličnog sastavau potpunosti je različita (Red Bull i Burn Energy). Dobiveni rezultati pokazuju kako jedno od energetskih pića, Red Bull, ne sadrži niti benzojevu niti sorbinsku kiselinu, dok Burn Energy u sebi ima značajne udjele benzojeve ( $145 \text{ mg L}^{-1}$ ), a posebno sorbinske kiseline ( $223 \text{ mg L}^{-1}$ ).



## § 5. ZAKLJUČAK

Uzorkovanjem 25 različitih vrsta osvježavajućih bezalkoholnih pića slučajnim odabirom domaćih i stranih proizvođača, utvrđeno je kako se navedeni proizvođači pridržavaju propisanih dopuštenih količina konzervansa. Time se uvelike smanjuje mogućnost pojave štetnih učinaka na zdravlje. Određene vrste pića sadrže samo jedan od konzervansa, dok drugi nije prisutan, odnosno nemoguće ga je detektirati zbog masene koncentracije manje od granice kvantifikacije. Ona pića koja sadrže konzervanse u količinama blizu gornjih dopuštenih granica, preporučljivo je preventivno pokušati izbjegavati.

Najveći udjeli benzojeve kiseline ( $139 \text{ mg L}^{-1}$ ) pronađeni su u negaziranim i izotoničnim sportskim pićima na bazi voća (ProSport Superfruits i JuicyFruits Narančanektarina), dok su velike masene koncentracije sorbinske kiseline ( $247 \text{ mg L}^{-1}$ ) prisutne u negaziranim kako i u gaziranim pićima (Schweppes Pink Grapefruit i JuicyFruits Multivitamin). Značajne razlike dobivene su između pića sličnih karakteristika, kao što su energetska pića u jednom je utvrđen značajan udio konzervansa, a u drugom ne.

Dobra strana benzojeve i sorbinske kiseline, uz njihovo učinkovito antimikrobno djelovanje, je njihova jednostavna i brza eliminacija iz tijela. Poznavajući sve činjenice vezane uz prisutnost konzervansa u prehrambenim proizvodima, moguće je zaključiti kako ne predstavljaju ozbiljne rizike za ljudsko zdravlje ukoliko se konzumiraju u stručno preporučenim količinama te da proizvođači osvježavajućih bezalkoholnih pića poštuju propisanu Uredbu br. 1333/2008 Europskog Parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2008. godine o prehrambenim aditivima.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

$a_w$  – aktivitet vode

ADI – prihvatljivi dnevni unos (engl. *acceptable daily intake*)

FAO – Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*)

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

GRAS – općenito prepoznato kao sigurno (engl. *generally recognized as safe*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

LOAEL – najmanja količina aditiva koja može djelovati štetno (engl. *lowest observed adverse effect level*)

NOAEL – najveća količina aditiva kod koje nisu uočeni nikakvi toksični učinci (engl. *no observed adverse effect level*)

RSD – relativno standardno odstupanje

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Ferreira, M. Caroch, *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, Massachusetts, 2019, str. 419–427.
2. M. Zeece, *Introduction to the Chemistry of Food*, Academic Press, Massachusetts, 2020, str. 251–311.
3. <https://www.faiia.org.uk/e-numbers/> (datum pristupa 3. lipnja 2020.)
4. Đ. Vasić-Rački, K. Galić, F. Delaš, T. Klapac, D. Kipčić, M. Katalenić, N. Dimitrov, B. Šarkanj, *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*, Grafika d.o.o., Osijek, 2010, str. 196–246.
5. S. Vara, M. K. Karnena, B. K. Dwarapureddi, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, Vol. 6, Academic Press, Massachusetts, 2019, str. 179–201.
6. J. Šego, *Utjecaj benzoata i sorbata na rast odabranih vrsta plijesni roda Penicillium*, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015, str. 15–19.
7. I. J. Joye, *Encyclopedia of Food Chemistry*, Vol. 1, Elsevier, Massachusetts, 2019, str. 1–9.
8. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/242381?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_benzoic%20acid-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/242381?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_benzoic%20acid-_-srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.)
9. K. Jorge, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, Massachusetts, 2003, str. 5346–5352.
10. T. Shibamoto, L. F. Bjeldanes, *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press, Massachusetts, 1993, str. 157–182.
11. A. Nan, *Side Effects of Drugs Annual*, Vol. 38, Elsevier, Massachusetts, 2016, str. 1–562.
12. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18106?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_sodium%20benzoate-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/18106?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_sodium%20benzoate-_-srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.)
13. Z. Berk, *Food Process Engineering and Technology*, Academic Press, Massachusetts, 2013, str. 351–354.
14. [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1626?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_sorbic%20acid-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s1626?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_sorbic%20acid-_-srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.)

15. L. K. Everis, G. Betts, *Reducing Salt in Foods*, Vol. 6, Woodhead Publishing, Sawston, 2019, str. 129–155.
16. P. Dehghan, A. Mohammadi, H. Mohammadzadeh-Aghdash, J. Ezzati, N. Dolatabadi, *Trends Food Sci.Tech.*, **80** (2018) str. 123–130.
17. [https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sial/85520?lang=en&region=HR&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_potassium%20sorbate-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sial/85520?lang=en&region=HR&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_potassium%20sorbate-_-srpRecs3-1) (datum pristupa 7. prosinca 2020.)
18. E. Mani-López, M. A. Ríos-Corripio, A.C. Lorenzo-Leal, E. Palou, A. López-Malo, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, Vol. 2, Academic Press, Massachusetts, 2019, str. 31–67.
19. N. J. Russell, G. W. Gould, *Food Preservatives*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003, str. 321–348.
20. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1997\\_02\\_23\\_314.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1997_02_23_314.html) (datum pristupa 30. svibnja 2020.)
21. V. N. Kalpana, V. Devi Rajeswari, *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*, Vol. 1, Academic Press, Massachusetts, 2019, str. 1–30.
22. A. del Olmo, J. Calzada, M. Nuñez, *Crit. Rev. Food Sci.*, **57** (2017) str. 3084–3103.
23. R. Walker, *Food Addit. & Contam.*, **7** (1990) str. 671–676.
24. F. Martins, M. A. Sentanin, D. de Souza, *Food Chem.*, **272** (2019) str. 732–750.
25. R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, *Handbook of Food Anal. Chem.*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2005, str. 26–36.
26. G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K. A. Schug, *Anal. Chem.*, (2013) str. 31–36.
27. K. Lazarić, *Svijet po mjeri*, **1** (2002) str. 5–23.
28. T. Jansen, L. Claassen, I. van Kamp, D. Timmermans, *Food Chem. Toxicol.*, **136** (2020) str. 3–29.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Sara Ivezić

Datum rođenja: 23. veljače 1996.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

### Obrazovanje

2003–2011 Osnovna škola „Blaž Tadijanović”, Podvinje

2011–2015 Srednja škola „Gimnazija Matija Mesić”, Slavonski Brod

2015–2018 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

2018-2020 Diplomski studij kemije; Istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu