

JAFES

VOL. 62_2014

ISSN 2545-4315

**JOURNAL OF
AGRICULTURAL, FOOD
AND ENVIRONMENTAL
SCIENCES**

**International Scientific
Journal**

**INTERNATIONAL SCIENTIFIC JOURNAL
JOURNAL OF AGRICULTURAL, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES**

<http://www.fzhn.ukim.edu.mk/jafes/>

The JAFES is an International scientific peer-reviewed Open Access Journal published twice a yearly
JAFES On line (e-ISSN 2545-4315) offers free access to all articles at <http://www.fzhn.ukim.edu.mk/jafes/>

Published by:	Издава:
"Ss. Cyril and Methodius" University in Skopje, Faculty of Agricultural sciences and food-Skopje	Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје

Advisory board	Издавачки совет
----------------	-----------------

EDITORIAL BOARD	УРЕДУВАЧКИ ОДБОР
-----------------	------------------

Editor in Chief	Главен уредник
-----------------	----------------

Vjekoslav Tanaskovikj , Skopje, Macedonia	Вјекослав Танасковиќ , Скопје, Македонија
Kocho Porchu , Skopje, Macedonia	Кочо Порчу , Скопје, Македонија

Associate Editor

Snezana Jovanovic, Belgrade, Serbia
Jovica Vasin, Novi Sad, Serbia
Radmila Stikić, Belgrade, Serbia
Biljana Škrbić, Novi Sad, Serbia
Ana Marjanovic Jeromel, Novi Sad, Serbia
Bojan Srdljević, Novi Sad, Serbia
Zoran Rajić, Belgrade, Serbia
Jasmina Havranek, Zagreb, Croatia
Mirjana Herak- Ćustić, Zagreb, Croatia
Vlasta Piližota, Osijek, Croatia
Ivo Tursich, Zagreb, Croatia
Darko Vončina, Zagreb, Croatia
Zlatan Sarić, Sarajevo, B&H
Josip Ćolo, Sarajevo, B&H
Muhamed Brka, Sarajevo, B&H
Velibor Spalević, Podgorica, Montenegro
Bozidarka Marković, Podgorica, Montenegro
Nazim Gruda, Bonn, Germany
Venelin Roychev, Plovdiv, Bulgaria
Nasya Tomlekova, Plovdiv, Bulgaria
Irena Rogelj, Ljubljana, Slovenia
Drago Kompan, Ljubljana, Slovenia
Michael Murković, Graz, Austria
Hristaq Kume, Tirana, Albania
Sonja Srbinovska, Skopje, Macedonia
Marjan Kiprijanovski, Skopje, Macedonia
Marina Stojanova, Skopje, Macedonia
Biljana Kuzmanovska, Skopje, Macedonia
Mirjana Jankulovska, Skopje, Macedonia
Dragi Dimitrievski, Skopje, Macedonia

Уредници

Снежана Јовановић, Белград, Србија
Јовица Васин, Нови Сад, Србија
Радмила Стикић, Белград, Србија
Билјана Шкрбић, Нови Сад, Србија
Ана Марјановић Јеромел, Нови Сад, Србија
Бојан Срдљевич, Нови Сад, Србија
Зоран Рајић, Белград, Србија
Јасмина Хавранек, Загреб, Хрватска
Мирјана Херак-Чустич, Загреб, Хрватска
Иво Туршич, Осиек, Хрватска
Власта Пилижота, Загреб, Хрватска
Дарко Вончина, Загреб, Хрватска
Златан Сарич, Сарајево, БиХ
Јосип Чоло, Сарајево, БиХ
Мухамед Брка, Сарајево, БиХ
Велибор Спалевич, Подгорица, Црна Гора
Божидарка Марковић, Подгорица, Црна Гора
Назим Груда, Бон, Германија
Венелин Ројчев, Пловдив, Бугарија
Насија Томлекова, Пловдив, Бугарија
Ирена Рогелј, Љубљана, Словенија
Драго Компан, Љубљана, Словенија
Михаел Мурковић, Грац, Австрија
Христаќ Куме, Тирана, Албанија
Соња Србиновска, Скопје, Македонија
Марјан Кипријановски, Скопје, Македонија
Марина Стојанова, Скопје, Македонија
Билјана Кузмановска, Скопје, Македонија
Мирјана Јанкуловска, Скопје, Македонија
Драги Димитриевски, Скопје, Македонија

JOURNAL OF AGRICULTURAL, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Address (Editorial Board)	Адреса (Редакција)
"Ss. Cyril and Methodius" University in Skopje Faculty of Agricultural sciences and food-Skopje P.O. Box 297, MK-1000 Skopje, Republic of Macedonia	Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје Факултет за земјоделски науки и храна - Скопје п. фак. 297, МК-1000 Скопје, Република Македонија
E-mail: jafes@fzhn.ukim.edu.mk	

**THE AUTHORS ARE RESPONSIBLE FOR THE CONTENT AND FOR THE LANGUAGE OF THEIR CONTRIBUTION*

СОДРЖИНА

Биљана Петановска – Илиевска, Владимир Арсов, Ленче Велкоска - Марковска, Мирјана С. Јанкуловска
МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БЕНЗОАТИ И СОРБАТИ ВО ХРАНА
1-12

Велкоска - Марковска Ленче, Петановска - Илиевска Биљана
ПРИМЕНА НА РЕВЕРЗНО-ФАЗНА ВИСОКОЕФИКАСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА
ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АКТИВНИТЕ КОМПОНЕНТИ ВО ПРЕПАРАТОТ INTER OF
13-21

Тања Силјановска, Мирјана С. Јанкуловска, Ленче Велкоска – Марковска, Биљана Петановска – Илиевска
ВЛИЈАНИЕ НА АМБАЛАЖНИОТ МАТЕРИЈАЛ ВРЗ КВАЛИТЕТОТ И БЕЗБЕДНОСТА НА
ПРЕХРАНБЕНИТЕ ПРОИЗВОДИ
23-28

Даниела Димовска, Мирјана С. Јанкуловска, Ленче Велкоска – Марковска, Биљана Петановска – Илиевска
ВЛИЈАНИЕ НА АМБАЛАЖАТА ВРЗ РОКОТ НА ТРАЕЊЕ НА ПРЕХРАНБЕНИТЕ ПРОИЗВОДИ
29-37

Биљана Петановска – Илиевска, Горан Јанев, Ленче Велкоска - Марковска, Мирјана С. Јанкуловска
МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АСПАРТАМ ВО ХРАНА
39-44

МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА БЕНЗОАТИ И СОРБАТИ ВО ХРАНА

Биљана Петановска – Илиевска, Владимир Арсов, Ленче Велкоска-Марковска, Мирјана С. Јанкуловска*

Универзитет Св Кирил и Методиј, Факултет за земјоделски науки и храна,
1000 Скопје, Р. Македонија;

e-mail: bpetanovska@fznh.ukim.edu.mk; bpetan88@yahoo.com

Апстракт

Во трудот се презентирани добиените резултатите од определувањето на бензоати и сорбати во различни примероци на храна со помош на високо-ефикасната течна хроматографија и UV спектроскопијата. Добиените резултати од испитувањата покажаа дека HPLC методот 1, се одликува со точност и прецизност за определување на бензоати и сорбати во сирење, џем, желе, мармалад и масти.

Вкупното време за анализа на испитуваните примероци (екстракција и HPLC анализа) е помало од 20 min.

Кај HPLC методот 2, натриум салицилат е искористен како внатрешен стандард за да се подобри прецизността и точноста на методот. Резултатите од испитувањата покажаа дека некои соединенија кои се додаваат во колачите како што е ванилата и ароматичните материи од јогуртот и киселите краставички може да интерферираат врз сигналот од натриум бензоат и калиум сорбат.

Концентрациите за бензоати и сорбати што се добиени со употреба на HPLC методот 2 се пониски во однос на концентрациите добиени со употреба на UV методот.

Клучни зборови: бензоати, сорбати, HPLC, храна

METHODS FOR DETERMINATION OF BENZOATES AND SORBATES IN FOOD

Biljana Petanovska-Ilievska, Vladimir Arsov, Lence Velkoska - Markovska, Mirjana S. Jankulovska*
Email: bpetanovska@fznh.ukim.edu.mk; bpetan88@yahoo.com

Faculty of Agricultural Sciences and food, "Ss. Cyril and Methodius" University, Skopje, Republic of Macedonia

Abstract

The results obtained from determination of benzoates and sorbates in different food matrix using High performance liquid chromatography and UV spectroscopy are presented in this paper. The obtained results from determination, using HPLC method 1, is accurate and precise enough for determination of benzoates and sorbates in cheese, jam, jelly, marmalade and fat. The total time for analysis of test samples (extraction and HPLC analysis) is less than 20 min.

For HPLC method 2, sodium salicylate is used as an internal standard to improve the precision and accuracy of the method. The tests results showed that some compounds added in cookies as vanilla and flavoring substances in yoghurt and pickles, interferes with sodium benzoate and potassium sorbate signals.

The obtained concentrations of benzoates and sorbates using HPLC method 2 were lower than the obtained concentration using UV method.

Key words: benzoates, sorbates, HPLC, food

Вовед

Конзерванси (антисептици) се материи со одреден хемиски состав коишто при одредени услови го успоруваат или го спречуваат развивањето на микроорганизмите што се присутни во

прехранбените производи при што значително не влијаат на органолептичките својства на намирниците (Modic P., 2001).

Конзервансите се едни од 26-те главни категории на адитиви коишто се користат во преработката на храна и се оценуваат многу пати пред да се започне со нивната

употреба. Притоа, Научниот комитет за храна (SCF – Scientific Committee on food), Европската агенција за безбедност на храна (EFSA – European Food Safety Authority) и Заедничкиот Комитет на Експерти за Адитиви во храна при Организацијата за храна и земјоделство (ОХЗ) и Светската Здравствена Организација (СЗО) треба да потврдат дека се безбедни за употреба. Правилата за употреба на адитивите во храна (дефиниции, услови за употреба, означување и процедури) се дадени со Директивата 95/2ЕС која е заменета со Регулативата (ЕС) 1333/2008 (<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives>). Максималните количества на конзервансите, во зависност од типот на храната, се дадени во Регулативата на Европската Комисија бр. 1129/2011, а во Р. Македонија со Правилникот за адитивите што се употребуваат во производство на храната (Сл. весник на Р.М. бр. 31 од 2012 год.). Количествата што се додаваат се дефинирани врз основа на технолошката потреба на типот на производот (Davidson P. M и сор., 2005).

Сепак, недостатокот на точно определени категории на храна, желбата за профит, и погодноста на адитивите да ги подобрат сензорните својства, конзистентноста, врзувањето на водата, оставање на впечаток на оригинална суровина, се причина што понекогаш се надминува тенката црвена линија за употребата на одреден адитив во храната (Šarkanj B., и сор. 2010). Најчестите форми на незаконска употреба на адитиви се кога не постои:

1. Технолошка оправданост за нивното додавање, со што се создава: фалсификување на основните суровини, прикривање на лошиот технолошки процес, разликување од исти производи.

2. Усогласеност со основните принципи за употребата на адитивите: кога станува збор за сосема нови производи, кај кои е во прашање целта за додавање на одредени адитиви, не декларирање на додадените адитиви или, пак, употреба на адитиви кои не се на листата на дозволени.

Меѓу почесто употребуваните адитиви спаѓаат конзервансите кои често се употребуваат во производите од овошје и зеленчук, при преработка на месо, во производството на сокови, газирани безалкохолни пијалаци, разни слатки

десерти, мајонез, кечап, сосови, вина и пива, некои видови на сирења и др.. Општо земено, конзервансите се употребуваат во сите гранки на прехранбената индустрија (Deshpande S.S., 2002; Modic P., 2001)

Бензоатите и сорбатите се меѓу најчесто користените конзерванси, иако одредни испитувања покажаа дека нивната прекумерна употреба може да предизвика алергиска реакција, уртикарија, дерматитис и т.н. (Mahboubifar, 2010).

Бензоевата киселина е една од најстарите хемиски конзерванси што се користи во козметичката, фармацевтската и прехранбената индустрија (Davidson, 2005). Натриум бензоатот е првиот хемиски конзерванс одобрен од американската агенција за храна и лекови. Употребата на бензоевата киселина во прехранбената индустрија е започната во 1900 година (Lueck, 1980). Бензоевата киселина има неколку предности како ниска цена, лесно се вклопува во производите и е со релативно ниска токсичност. Бензоевата киселина е растворлива во вода, но натриум бензоатот е повеќе растворлив во вода отколку бензоевата киселина. Поради оваа причина натриум бензоатот се користи во многу случаи.

Сорбинската киселина и нејзините соли се употребуваат како антиботулински агенси во месни производи особено во комбинација со нитритите за редукција на нитрозамин. Во моментот, сорбинската киселина и нејзините соли сорбати (особено калиум сорбат) се употребуваат низ целиот свет како конзерванси во различни видови храна како: храна за животни, фармацевтски производи, козметички производи и друга индустриска употреба. Максимално дозволена концентрација на бензоатите во безалкохолни пијалаци е 150 mg/L изразено како бензоева киселина. Максимално дозволена концентрација на сорбати е, исто така, изразена како сорбинска киселина и изнесува 300 mg/L кога се употребува поединечно или 250 mg/L кога се употребува во комбинација со бензоати. Максималните дозволени концентрации се однесуваат на храна готова за консумирање којашто е приготвена според инструкциите на производителите (Davidson, 2005).

За квантитативно определување на бензоати и сорбати во различни матрици се

користат различни методи како што се: UV спектроскопија, тенкослојна хроматографија, гасна хроматографија. Традиционалните волуметриски титрации, обично бараат обемна подготовка на примерокот.

Методите на гасната хроматографија се прилично сложени и се состојат од неколку екстракции, испарување и дериватизација, со што се намалува аналитичката прецизност и точност.

Методите на високо ефикасната течна хроматографија (HPLC) се повеќе привлечни за таа цел и нудат можност за прецизна и точна анализа и поради тоа најчесто се употребуваат.

Neda Bahremand (2013) анализираше бензоати и сорбати во ирански традиционален пијалак со HPLC метод и UV спектрофотометрија, а потоа извршила споредба на двете методи.

Marjan Mahboubifar (2010) анализираше бензоати и сорбати во прехранбени производи со HPLC метод и UV спектрофотометрија.

Anna Filipiak и сор., (2010) анализирале бензоати, сорбати и цитрати со хроматографски и електромиграциски методи.

Mahmood Ahmed (2013) анализираше натриум бензоат и калиум сорбат со HPLC во овошни сокови, газирани пијалаци, млеко, сирење, сосови, масти од растително и анимално потекло, мармалади и маргарини.

За да се спречи прекумерната изложеност на потрошувачите на конзерванси и да се спречи нивната злоупотреба од страна на производителите неопходна е контрола на прехранбените производи. Од овие причини, целта на овој труд е да се направи преглед на најчесто користените методи за нивно квантитативно определување во храна од различно потекло.

Материјал и методи

Материјали и методи за определување на бензоати и сорбати во прехранбени производи со HPLC меетоди

Реагенси: за HPLC методот употребени се следниве реагенси: метанол (Sigma Aldrich-USA), ацетонитрил (Fischer Scientific-UK), **Овошни сокови и газирани пијалаци:** 1 mL од секој овошен сок и газирани пијалак

n-хексан (Fischer Scientific-UK), натриум бензоат (RDH-Germany), калиум сорбат (RDH-Germany), диетил етер (Fischer Scientific-UK), натриум ацетат (Merck-Germany), сулфурна киселина (Merck-Germany), натриум хидроксид (Merck-Germany), етанол, калиум фосфат (Ahmed M., 2013).

Хроматографски услови: системот што е користен за испитување на натриум бензоат и калиум сорбат е HPLC со UV детектор. Раздвојувањето на пиковите е спроведено на температура од 25 °C, на колона од типот C₁₈, со димензии 250 mm x 4,6 mm; 5 µm, брзина на проток од 1 mLmin⁻¹, ацетонитрил како мобилна фаза и волумен на инјектирање 100 µL. Детекцијата на натриум бензоат е изведена на бранова должина од 227 nm на којашто покажува максимална апсорпција, а на калиум сорбатот на 250 nm. Калиум сорбатот и натриум бензоатот во примероците се детектирани со споредба на нивните UV спектри и ретенциското време од стандардните раствори (Ahmed M., 2013).

Подготовка на стандарден раствор: натриум бензоатот (100 mg) и калиум сорбатот (100 mg) се растворени во 100 mL HPLC чиста вода за да се добие стандарден раствор. Стандардните работни раствори од 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, и 75 mg L⁻¹ натриум бензоат и 3 mg L⁻¹, 9mgL⁻¹, 15 mg L⁻¹, 21 mg L⁻¹, 27 mg L⁻¹ калиум сорбат се подготвени со растворање на стандардниот раствор со мобилната фаза (Ahmed, 2013).

Примероци и нивна подготовка: примероците за анализа се земени од локални производители. Во анализата се вклучени 11 овошни сокови, 23 газирани пијалаци, 6 млечни примероци, 11 производи од џем, 10 производи од мармалад, 10 примероци од сирење, 10 примероци од маргарин, 11 видови сосови и 6 примероци на масти. Во зависност од типот на производот користен е различен начин на екстракција. Растворите на примероците се филтрираат низ 0,45 µm хартија и се сонифицирани пред инјектирањето во HPLC системот (Ahmed M., 2013).

по сонификацијата се земени и се растворени во 9 mL HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Млеко: 2 mL млеко е центрифугирано со заситен раствор од калиум фосфат за време од 30 минути. 1 mL од центрифугатот се раствора со 9 mL HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Сирење: 1,0 g сирење се раствора во 40 mL етанол и се меша 30 минути. Потоа се филтрира низ Whatmann-ова филтер хартија и 1 mL од филтратот се раствора во 9 mL HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Џем, желе и мармалад: Примероците од џемот, желеото и мармаладот се хомогенизираат и се раствораат со метанол во одмерен сад од 25 mL. Потоа се центрифугира, филтрира и се раствора во 9 mL HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Маси од растително или анимално потекло и сосови: 0,1 g од масите и сосовите се раствораат со 2 mL *n*-хексан. Потоа со 10 mL ацетатен пуфер (pH 4,4) се врши течно-течна екстракција, по што се центрифугира, филтрира и се раствора со HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Маргарин: 1 g маргарин се раствора во 10 mL диетил етер и потоа се пристапува кон течно-течна екстракција со 0,1M раствор на натриум хидроксид. 1 mL сулфурна киселина се додава на основниот раствор во 25 mL волуметриска тиквичка и се раствора до соодветен волумен со HPLC чиста вода (Ahmed M., 2013).

Материјали и методи за определување на бензоати и сорбати во прехранбени производи со HPLC метод и UV спектрофотометрија

Реагенси: калиум сорбат, натриум сорбат, натриум салицилат, амониум ацетат, петролбензен и хлороводородна киселина се купени од Merck (Germany). Метанол и ацетонитрил се набавени од Caledon (Canada), (Mahboubifar, 2010).

Подготовка на стандарден раствор за UV метод : 100 mg од натриум бензоат или калиум сорбат се раствораат во 100 mL волуметриска тиквичка. Разредувањето на основните раствори се врши со дестилирана вода за да се добие 60 mg/L, 50 mg/L, 40 mg/L, 30 mg/L, 20 mg/L и 10 mg/L стандардни раствори на натриум бензоат и калиум сорбат. 0,4 mL хлороводородна киселина се додава на 5 mL од секој стандарден раствор и се екстрахира со 45

mL петролбензен. Апсорбанцата од стандардните примероци е мерена на 227 nm за натриум бензоат и 250 nm за калиум сорбат (Mahboubifar, 2010).

Подготовка на примероците: 10 g од примероците на колачиња, јогурт и кисели краставички се подготвени со блендирање со 90 mL дестилирана вода за време од 2 min. Блендираниот примерок е филтриран, а потоа е додадено 0,4 mL хлороводородна киселина на 5 mL од филтрираната течност, по што се екстрахира со 45 mL петролбензен. Течните примероци се подготвени со додавање на 0,4 mL хлороводородна киселина на 5 mL од примерокот и се екстрахираат со 45 mL петролбензен (Mahboubifar, 2010).

UV апаратура: анализата е изведена со Shimadzu UV Vis спектрофотометар (Mahboubifar, 2010).

Подготовка на стандарден раствор за HPLC метод: 100 mg од натриум бензоатот и калиум сорбатот се додаваат во 100 mL волуметриска тиквичка и се доведуваат до соодветен волумен со HPLC чиста вода. Разредувањето на основните раствори се врши одделно во HPLC чиста вода за да се добие 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L, 62,5 mg/L и 31,25 mg/L од растворите на натриум бензоат и калиум сорбат. 1000 mg/L од внатрешниот стандард (натриум салицилат) и 1000 µL од секој работен работен раствор од натриум бензоат и калиум сорбат се раствораат 1:10 со мобилната фаза во 10 mL волуметриска тиквичка за да се добијат 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12,5 mg/L, 6,25 mg/L и 3,12 mg/L, стандардни раствори за калибрација (Mahboubifar, 2010).

Подготовка на мобилната фаза: мобилната фаза се состои од 80 % амониум ацетатен пуфер (pH 4,2) и 20 % ацетонитрил со HPLC чистота. По подготовката, мобилната фаза е измешана, дегазирана и филтрирана низ најлонски филтер (Mahboubifar, 2010).

Подготовка на примероците: примероците се подготвени со блендирање на 10 g од цврстите примероци и 10 mL од течните примероци со 90 mL дејонизирана вода во времетраење од две минути. Блендираниот примерок се филтрира и 2 mL од филтрираната течност и 200 µL од внатрешниот стандард се раствораат во мобилната фаза. По растворањето сите

примероци (цврсти и течни) се филтрираат низ најлонски филтер со големина на пори $0,45 \mu\text{m}$ (Mahboubifar, 2010). **HPLC апаратура:** анализата е изведена со HPLC систем со UV детектор на собна температура. Елуирањето е изократско, а инјектираниот волумен изнесува $20 \mu\text{L}$. Хроматографската колона на која е изведена анализата е C 18, $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 250 \text{ mm}$, брзината на проток е $0,8 \text{ mL/min}$, а UV детекцијата е изведена на 225 nm (Mahboubifar, 2010).

Резултати и дискусија

Со користење на HPLC методот (метод 1) лимитот на детекција и лимитот на квантификација се одредени од калибрациската крива со користење на селедниве равенки:

$$\text{MDL} = y_b + 3s_b$$

$$\text{MQL} = y_b + 10s_b$$

Каде y_b е пресек со регресијата права и s_b е стандардна девијација од пресекот на регресијата права (Ahmed M., 2013).

Аналитичките карактеристики од HPLC методот за квантификација на натриум бензоат и калиум сорбат се дадени во Табела 1. Имено, во Табела 1 се презентирани добиените резултати за лимитот на детекција и лимитот на квантификација на методот. Лимитот на детекција за натриум бензоат изнесува $0,231 \text{ mgL}^{-1}$ а лимитот за квантификација е $0,772 \text{ mg L}^{-1}$. За калиум сорбат лимитот на детекција е $0,018 \text{ mgL}^{-1}$ а лимитот за квантификација е $0,060 \text{ mgL}^{-1}$.

За да се добие поголема сензитивност, натриум бензоатот и калиум сорбатот се анализирани на бранова должина на којашто покажуваат максимална

апсорпција (277 nm за натриум бензоат и 250 nm за калиум сорбат). Ретенциското време за натриум бензоат е 3 min , а за калиум сорбат $3,3 \text{ min}$. Идентификацијата на пиковите од примерокот е потврдена со UV спектрите ($200\text{-}400 \text{ nm}$) и со споредување на нивното ретенциско време со стандардните раствори. Со овој метод се анализирани вкупно 109 примероци (Табела 2.) (Ahmed, 2013).

Во течните примероци анализирани се сокови од јаболка, манго, боровинка, праска, газирани пијалаци, сосови и млеко. Цврстите примероци вклучуваат: сирење, џем, желе, мармалад и масти. Кај наведените примероци се анализирани двата конзерванси: натриум бензоат и калиум сорбат. Примероците се групирани во две категории: примерци кај коишто конзервансите се декларирани и примероци кај коишто конзервансите не се декларирани (Ahmed, 2013). Од вкупно 109 примероци кои се анализирани, натриум бензоат е определен во 74 примероци (Табела 2.) а калиум сорбат кај 25 примероци (Табела 3.). Натриум бензоат е повеќе употребуван конзерванс во сите производи додека калиум сорбатот не е употребен во овошните сокови, газирани пијалаци и млечните производи. Заради различните видови микроорганизми, рН на супстратот и други фактори, минималната концентрација на конзерванси која е потребна за спречување на микробен раст може да варира. Растот на повеќето мувли и квасци се инхибира со натриум бензоат во концентрација од $20\text{-}200 \text{ mgL}^{-1}$ на и од калиум сорбат ($10\text{-}1000 \text{ mgL}^{-1}$) (Ahmed, 2013).

Табела 1. Аналитички карактеристики на HPLC методот

Table 1. Analytical characteristics for HPLC method

Компоненти	Концентрациско подрачје (mgL^{-1})	Лимит на детекција (mgL^{-1})	Лимит за квантификација (mgL^{-1})
Натриум бензоат	5 - 75	0,231	0,772
Калиум сорбат	3 - 27	0,018	0,060

Табела 2. Концентрација на натриум бензоат во испитуваните примероци
Table 2. Sodium benzoate concentration in analyzed sample matrixes

Вид на храна	Број на анализирани примероци	Просечна концентрација (mgL ⁻¹) ± SD	Min (mgL ⁻¹)	Max (mgL ⁻¹)
Овошни сокови	11	34,58 ± 13,29 (D=11)	5,06	53,42
Газирани пијалоци	23	23,25 ± 6,13 (D=23)	1,03	60,76
Млеко	6	28,67 ± 2,62 (D=6)	6,25	31,81
Џем	11	26,64 ± 2,62 (D=6)	20,01	34,21
Желе	11	29,14 ± 1,79 (D=6)	18,92	35,05
Мармалад	10	10,34 ± 1,62 (D=5)	4,78	21,43
Сирење	10	15,34 ± 1,02 (D=5)	6,18	19,18
Маргарин	10	17,34 ± 1,22 (D=5)	5,39	18,74
Сосови	11	12,44 ± 2,62 (D=7)	3,66	22,97
Маси	6	-	-	-

SD – стандардна девијација; D – определено во одреден број примероци

Табела 3. Концентрација на калиум сорбат во испитуваните примероци
Table 3. Concentration of potassium sorbate in analyzed sample matrix

SD – стандардна девијација; D – определено во одреден број примероци

Вид на храна	Број на анализирани примероци	Просечна концентрација (mgL ⁻¹) ± SD	Min (mgL ⁻¹)	Max (mgL ⁻¹)
Овошни сокови	11	-	-	-
Газирани пијалаци	23	-	-	-
Млеко	6	-	-	-
Џем	11	4,36 ± 1,20 (D=5)	3,52	5,89
Желе	11	9,04 ± 2,62 (D=5)	3,58	13,03
Мармалад	10	5,01 ± 0,54 (D=5)	4,04	6,98
Сирење	10	7,91 ± 2,04 (D=5)	3,44	8,18
Маргарин	10	8,31 ± 1,54 (D=5)	3,24	9,35
Сосови	11	5,51 ± 0,84 (D=4)	5	6,14
Маси	6	11,22 ± 4,32 (D=6)	4,85	14,48

SD – standard deviation; D – determined in certain number of samples

Табела 4. Точност на методата за натриум бензоат
Table 4. Accuracy of the method for sodium benzoate

Вид на храна	Концентрација пред додаден аналитички стандард (mgL ⁻¹)	Додадена концентрација (mgL ⁻¹)	Точноста на методата (%) ± SD
	5,06	2,5	98,01 ± 1,91
Овошен сок	21,62	5,0	92,04 ± 1,98
	53,42	7,5	97,32 ± 1,53
Газирани пијалаци	1,03	2,5	99,21 ± 1,01
	31,02	5,0	97,54 ± 1,11
	60,76	7,5	96,64 ± 1,54
Млеко	24,75	2,5	96,91 ± 1,11
	28,90	5,0	94,54 ± 1,91
	31,38	7,5	94,74 ± 1,11
Џем	20,01	2,5	94,91 ± 1,65
	10,65	5,0	93,54 ± 1,13
	34,21	7,5	92,61 ± 1,44
Желе	18,92	2,5	99,83 ± 1,91
	25,74	5,0	98,54 ± 1,05
	35,05	7,5	97,32 ± 1,88
Мармалад	4,78	2,5	99,83 ± 1,91
	10,65	5,0	98,54 ± 1,05
	21,43	7,5	97,32 ± 1,88
Сирење	6,18	2,5	92,43 ± 1,09
	9,87	5,0	97,04 ± 1,68
	19,18	7,5	99,95 ± 1,99
Маргарин	5,39	2,5	97,85 ± 1,06
	8,76	5,0	99,54 ± 1,71
	18,74	7,5	92,91 ± 1,72
Сосови	3,66	2,5	96,31 ± 1,93
	15,05	5,0	98,04 ± 0,1
	22,97	7,5	98,92 ± 1,09

За проверка на точноста на методот познато количество на натриум бензоат и калиум сорбат е додадено во три различни концентрации и тоа: 2,5 µg mL⁻¹, 5,0 µg mL⁻¹ и 7,5 µg mL⁻¹ (Ahmed, 2013).

Резултатите за точноста на методот се движат во граници од 92,04 % ± 1,98 % до 99,95 % ± 1,99 % за натриум бензоат и од 90,81 % ± 1,16 % до 99,55 % ± 1,76 % за калиум сорбат. Точноста на методот е дадена во табелите (Ahmed, 2013).

Во трудот на Mahboubifar, 2010, направена е споредба помеѓу добиените резултати од HPLC анализата и UV спектрофотометрија (метод 2) од одредувањата на натриум бензоат и калиум сорбат во прехранбени производи. Линеарноста на UV методот е тестирана во концентрациското подрачје од 1 mg/L до 25 mg/L за калиум сорбат и 2 mg/L до 25 mg/L за натриум бензоат. Лимитот на детекција за натриум бензоат е 2 mg/L а за калиум сорбат 1 mg/L.

Табела 5. Точност на методот за калиум сорбат
Table 5. Accuracy of the method for potassium sorbate

Вид на храна	Концентрација пред додаден аналитички стандард (mgL ⁻¹)	Додадена концентрација (mgL ⁻¹)	Точноста на методата (%) ± SD
	5,15	2,5	95,97 ± 1,09
Сосови	5,15	5,0	99,87 ± 1,99
	6,14	7,5	94,22 ± 1,94
	4,85	2,5	95,54 ± 1,99
Масти	9,16	5,0	91,65 ± 1,65
	14,48	7,5	98,43 ± 1,54
	3,52	2,5	92,78 ± 1,54
Џем	4,18	5,0	99,55 ± 1,76
	5,89	7,5	93,31 ± 1,38
	3,58	2,5	91,92 ± 1,76
Желе	8,18	5,0	95,76 ± 1,99
	13,03	7,5	95,76 ± 1,93
	4,04	2,5	96,09 ± 1,87
Мармалад	5,01	5,0	93,88 ± 1,56
	6,98	7,5	94,33 ± 1,37
	3,44	2,5	97,34 ± 1,98
Сирење	5,54	5,0	92,77 ± 1,88
	8,18	7,5	97,66 ± 1,35
	3,24	2,5	90,81 ± 1,16
Маргарин	6,65	5,0	92,55 ± 1,77
	9,35	7,5	96,25 ± 1,71

Табела 6. Прецизност и точност на UV методот за натриум бензоат
Table 6. Precision and accuracy of UV method for sodium benzoate

γ (mg/L)	Просечна апсорбанца	Стандардна девијација	Определено количество (mg/L)	Точност на методата (%)
2	0,05	0,00	1,66	83,1
4	0,013	0,01	3,96	99,2
6	0,22	0,02	7,40	123,5
10	0,32	0,03	9,84	98,4
14	0,44	0,03	12,6	90,1

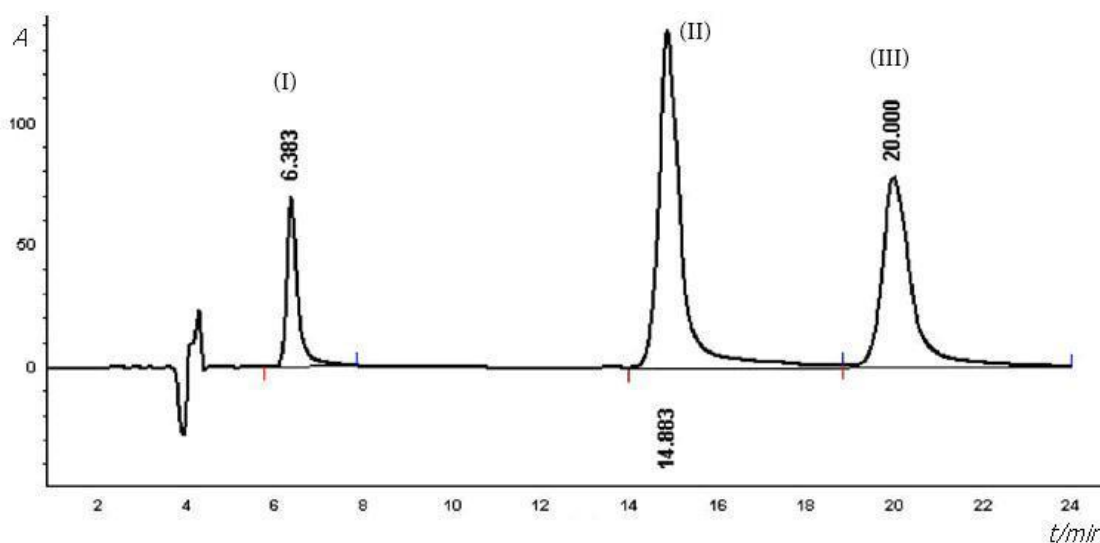
Линеарноста на HPLC методот е тестирана во концентрација од 1 до 550 mg/L за натриум бензоат и 1 до 1000 mg/L за калиум сорбат.

Од HPLC хроматограмот прикажан на Сл.1. може да се забележи дека ретенциското

време за натриум бензоат изнесува 14,8 min, за калиум сорбат 20 min и натриум салицилат (внатрешен стандард) изнесува 6,4 min (Mahboubifar, 2010).

Табела 7. Прецизност и точност на UV методот за калиум сорбат
Table 7. Precision and accuracy of UV method for potassium sorbate

γ (mg/L)	Просечна апсорбанца	Стандардна девијација	Определено количество (mg/L)	Точност на методата (%)
1,0	0,06	0,01	1,19	119,0
2,0	0,12	0,02	2,34	117,0
3,0	0,16	0,01	2,91	97,0
4,0	0,23	0,01	4,09	102,3
5,0	0,30	0,00	5,0	100,0
6,0	0,38	0,01	5,99	99,8



Слика 1. HPLC хроматограм на смеса од натриум салицилат (I), натриум бензоат (II) и калиум сорбат (III).

Fig.1. HPLC chromatogram of sodium salicylate (I), sodium benzoate (II) and potassium sorbate (III) mixture.

Во овој метод натриум салицилат е користен како внатрешен стандард за да се подобри репродуктивната и точноста на резултатите.

Лимитот на детекција за натриум бензоат и калиум сорбат изнесува 0,3 mg/L. Добиените резултати за прецизност и точност на UV методот за натриум бензоат и калиум сорбат се прикажани во Табела 6. и 7. Прецизноста и точноста за HPLC методот за натриум бензоат и калиум сорбат се определени со споредба на добиените резултати во текот на едnodневните и тридневните анализи (Таб. 8. и 9.). Резултатите од анализата за содржината на калиум сорбат и натриум бензоат во одредени примероци се дадени

во Табелите 10., 11. и 12. Со споредба на резултатите добиени од UV и HPLC методот, може да се забележи дека концентрациите што се добиени со употреба на HPLC методот се пониски во однос на концентрациите добиени со употреба на UV методот.

Повисоките резултати за содржината на бензоати и сорбати во тестираните продукти (јогурт, кисели краставички и колачиња) добиени со употреба на UV методот, покажуваат дека супстанциите што се присутни во матрицата како што се ванила во колачи, ароматичните соединенија во јогурт и кисели краставички интерферираат на добиениот сигнал од детекторот.

Табела 8. Прецизност и точност на HPLC методот за натриум бензоат
Table 8. Precision and accuracy of HPLC method for sodium benzoate

γ (mg/L)	Висина на пикот	Стандардна девијација	RSD (%)	Најдена концентрација (mg/L)	Точност на методата (%)
3,12	0,25	0,04	16,48	2,73	87,5
6,25	0,48	0,03	7,43	5,76	88,6
12,5	0,95	0,07	7,58	12,25	98,0
25,0	1,96	0,22	11,45	27,28	109,1
50	3,37	0,27	7,31	49,31	98,6
100	7,77	4	7,21	103,63	103,6

RSD – релативна стандардна девијација

RSD – relative standard deviation

Табела 9. Прецизност и точност на HPLC методот за калиум сорбат
Table 9. Precision and accuracy of HPLC method for potassium sorbate

γ (mg/L)	Висина на пикот	Стандардна девијација	RSD (%)	Најдена концентрација (mg/L)	Точност на методот (%)
3,12	0,13	0,02	14,55	2,33	74,7
6,25	0,25	0,03	10,30	5,73	87,7
12,5	0,49	0,05	10,71	11,05	88,4
25	0,99	0,13	13,61	23,79	95,1
50	1,91	0,22	11,47	49,60	99,2
100	3,72	0,34	9,14	98,53	98,5

Табела 10. Концентрација на натриум бензоат (mg/L) во јогурт определена со HPLC и UV метод
Table 10. Concentration of sodium benzoate (mg/L) in yogurt obtained with HPLC and UV method

Примероци на јогурт	γ (mg/L) _{UV}	γ (mg/L) _{HPLC}
1	74,5	Нема детектирано
2	61,0	Нема детектирано
3	120,4	117,0
4	108,1	11,60
5	68,3	13,4
6	148,8	135,8
7	57,0	18,0
8	67,6	Нема детектирано
9	63,7	39,0
10	88,2	52,9

Табела 11. Концентрација на калиум сорбат (mg/L) во примероци од колачи определени со UV и HPLC метод
 Table 11. Concentration of potassium sorbate (mg/L) in cookie sample determined by UV and HPLC method

Примерок од колачи	γ (mg/L) _{UV}	γ (mg/L) _{HPLC}
1	561,6	209,0
2	451,6	340,5
3	671,8	517,7
4	767,8	523,0
5	180,0	132,2
6	522,6	427,5
7	695,2	450,3
8	834,8	507,6
9	761,6	571,9
10	1169,4	625,4
11	213,2	141,7
12	1117,0	518,6
13	731,4	282,5
14	1266,2	373,6
15	1182,6	358,6
16	926,4	570,4

Табела 12. Концентрација на натриум бензоат (mg/L) во кисели краставички определена со UV и HPLC метод

Table 12. Concentration of sodium benzoate (mg/L) in pickles determined with UV and HPLC method

Примероци на кисели краставички	γ (mg/L) _{UV}	γ (mg/L) _{HPLC}
1	203,1	153,7
2	660,8	316,0
3	360,0	229,4
4	750,0	395,0
5	266,4	213,7
6	173,9	71,3
7	337,3	218,5

Табела 13. Точност на HPLC методот за натриум бензоат и калиум сорбат во колачи
 Table 13. Accuracy of HPLC method for sodium benzoate and potassium sorbate in cookies

Примерок	Додадено количество (mg/kg)	Точност за натриум бензоат	Точност за калиум сорбат
колачи	15	97,9 ± 0,1	83,2 ± 0,1
	30	102,4 ± 0,1	85,5 ± 0,1
	50	111,1 ± 1,3	96,2 ± 1,1

UV и HPLC методите се двете најчесто употребувани методи за одредување на натриум бензоат и калиум сорбат во лабораториите за анализа на храна и поради таа причинка извршена е споредба помеѓу нив. Кај HPLC методот натриум салицилат е искористен како внатрешен стандард за да се подобри точноста и прецизноста на методот.

За утврдување на прецизноста и точноста на HPLC методот спроведена е анализа на аналитички додаток, при што познати

количества на натриум бензоат и калиум сорбат се додадени во колачи (Таб.13.).

Заклучок

Врз основа на добиените резултати од испитувањата може да се заклучи дека UV и HPLC методите се најчесто употребувани за определување на натриум бензоат и калиум сорбат во храна.

HPLC методот 1, се одликува со точност и прецизност за определување на бензоати и сорбати во сирење, џем, желе, мармалад и масти.

Користените процедури за екстракција се економични, брзи и лесни за изведба. Вкупното време за анализа (екстракција и HPLC анализа) е помало од 20 min. Количествата на натриум бензоат и калиум сорбат во испитуваните примероци, добиени со употреба на HPLC методот 1 не ги надминуваат максимално дозволените концентрации.

Кај HPLC методот 2, натриум салицилат е искористен како внатрешен стандард за да се подобри прецизноста и точноста на методот.

Резултатите од испитувањата покажаа дека некои соединенија кои се додаваат во колачите како што е ванилата и ароматичните материи од јогуртот и киселите краставички може да интерферираат на сигналот од натриум бензоат и калиум сорбат.

Концентрациите за бензоати и сорбатив што се добиени со употреба на HPLC методот 2 се пониски во однос на концентрациите добиени со употреба на UV методот.

Bio-Inorg. Hybd. Nanomat., Vol. 2, No. 3, 429-435

9. Filipiak A., Jastrzębska A., Kurzawa M., Szłyk E., (2010). Determination of citrates, benzoates and sorbates in food samples by chromatographic and electromigration methods, XXV ARS SEPARATORIA – Toruń, Poland, pp 333-336

10. Mahmood Ahmed, (2013). Sodium benzoate and Potassium sorbate in Pakistani retail foodstuffs, University of the Punjab, Lahore-Pakistan, Institute of Chemistry, pp. 01-06;

11. Warth, A. D., (1991). Mechanism of action of benzoic acid on *Zygosaccharomyces bailii*: effects of glycolytic metabolite levels, energy reduction, and intracellular pH. Appl. Environ. Microbiol. 57:3410;

12. Salmond, C. V., Kroll, R. G., and Booth, I. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*, J. Gen Microbiol. 130:2845–2850.

13. Webb, J. L. (1966). Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 245.

Литература

1. Modic P., (2001). Upotreba prehrambenih aditiva, pojam, podela, propisi o koriscenju, bezbednost, oznacavanje (YU, INS, E liste), 2.
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives>
3. Davidson P. M., Sofos J. N and Branen A. L., (2005). Antimicrobials Third Edition, Taylor and Francis Group, LLC pp. 49-91;
4. Šarkanj B., Kipčić D., Vasić-Rački Đ., Delaš F., Galić K., Katalenić M., Dimitrov N., Klapac T., (2010). Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Osijek pp 196-242;
5. Deshpande S.S, (2002). Handbook of Food Toxicology Indus Therapeutics, Inc. Hyderabad, India
6. Marjan Mahboubifar, (2010). A Comparison between UV Spectrophotometer and High-performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Food Products, 4(2):150-154;
7. Lueck, E. (1980). Antimicrobial Food Additives, Springer-Verlag, New York.
8. Neda Bahremand, Soheil Eskandari, (2013). Determination of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate in "Doogh" by HPLC and Comparison with Spectrophotometry, Int. J.

ПРИМЕНА НА РЕВЕРЗНО-ФАЗНА ВИСОКОЕФИКАСНА ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АКТИВНИТЕ КОМПОНЕНТИ ВО ПРЕПАРАТОТ INTER OF

Велкоска-Марковска Ленче*, Петановска-Илиевска Биљана

¹Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје,
Република Македонија

*levemar@gmail.com, lencevm@zf.ukim.edu.mk

Апстракт

Во трудот се презентирани нови можности за разработка на релативно брзи, едноставни, прецизни и точни методи за истовремено определување на содржината на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на реверзно-фазна (RP) високоефикасна течна хроматографија (HPLC) и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV/DAD). За реализација на поставената цел се користени седум типови аналитички колони: Hypersil ODS (25 cm × 0,46 cm; 5 μm), HS 3 × 3 C-18 (3,3 cm × 0,46 cm; 3μm), HS 3 × 3 C-8 (3,3 cm × 0,46 cm; 3μm), LiChrospher 100 RP-18 (25 cm × 0,4 cm; 5 μm), Chromolith Performance RP-18e (10 cm x 0,46 cm), LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm x 0,4 cm; 5 μm) и LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 μm).

RP-HPLC методот е спроведен на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 μm), со примена на мобилна фаза составена од метанол/вода (60/40, V/V), проток од 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 АЕ.

За разработениот метод се определени следниве параметри: ретенциски фактор, сепарациски фактор, долна граница на детекција, долна граница на квантификација, дневна и интермедијарна прецизност за ретенциското време, површината под пиковите и висината на хроматографските пикови, типот на зависност помеѓу масата на аналитот и површината и/или висината на пиковите, аналитички принос и удел на активните компоненти во анализираните примероци од пестицидната формулација.

Клучни зборови: фенмедифам, десмедифам, етофумесат, Inter Of, RP-HPLC, UV/DAD

APPLICATION OF REVERSE-PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF ACTIVE COMPONENTS IN PESTICIDE INTER OF

Velkoska-Markovska Lenche*, Petanovska-Ilievaska Biljana

¹Faculty of Agricultural Sciences and food, “Ss. Cyril and Methodius” University, Skopje, Republic of
Macedonia

* levemar@gmail.com, lencevm@zf.ukim.edu.mk

Abstract

Fast, simple, precise and accurate methods development for simultaneous determination of active ingredients phenmedipham, desmedipham and ethofumesate in a pesticide formulation Inter Of using reversed-phase (RP) high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet diode array detector (UV/DAD) is presented in this work. For realization the established purpose seven analytical columns are used: Hypersil ODS (25 cm × 0.46 cm, 5 μm), HS 3 × 3 C-18 (3.3 cm × 0.46 cm, 3μm), HS 3 × 3 C-8 (3.3 cm × 0.46 cm, 3 μm), LiChrospher 100 RP-18 (25 cm × 0.4 cm, 5 μm), Chromolith Performance RP-18e (10 cm x 0.46 cm), LiChrospher 60 RP-select B (12.5 cm x 0.4 cm, 5 μm) and LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0.4 cm, 5 μm).

RP-HPLC method is carried out on a LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0.4 cm, 5 μm) analytical column, with mobile phase of methanol/water (60/40, V/V), flow rate of 1 mL/min, constant column temperature at 25 °C, UV detection at 230 nm and 0.5 AUFS sensitivity level.

The following parameters are determined for the developed method: retention factor, separation factor, limit of detection, limit of quantification, repeatability or intermediate precision of obtained results for retention time, peak area and peak height, the fit type between the mass of analyte and peak area or peak height, recovery of analyte and active ingredients quantity in a pesticide formulation.

Key words: phenmedipham, desmedipham, ethofumesate, Inter Of, RP-HPLC, UV/DAD

Вовед

Бројот на населението во светот е во постојан пораст и денес се проценува дека на нашата планета живеат околу седум милијарди луѓе. Еден од најважните проблеми на современиот човек е како да обезбеди доволно количество квалитетна и хигиенски исправна храна за целото население. Производството на поголеми количества земјоделски култури, како и нивно побезбедно чување во магацинските простори не може да се оствари без употреба на средства за заштита на растенијата (*Постоловски и сор.*, 2000). Се смета дека штетите причинети од фитопатогените микроорганизми, штетниците и плевелите доведуваат до намалување на приносите за околу 30-50 % (*Janic*, 2005). Неконтролираните плевели, коишто се појавуваат заедно со одгледуваните растенија, обично се причина за загуба од 50 % до 100 % на земјоделското производство, а хербицидите, или „хемиските убијци“ на плевелите се примарна алатка за справување со нив (*Deveikyte and Seibutis*, 2006). Оттука произлегува и потребата за примена на разни хемиски средства, особено пестициди, за заштита на примарните земјоделски производи.

Едни од почесто употребуваните хербициди во насадите од шеќерна репка се фенмедифам, десмедифам и етофумесат, коишто се користат поединечно или, пак, во смеса. Овие три хербицидни супстанции претставуваат активни компоненти на пестицидната формулација Inter Of, којашто се јавува во облик на течен концентрат за емулзија (EC, Emulsifiable Concentrate), производ на фирмата Хербос од Хрватска.

Фенмедифам, десмедифам и етофумесат се селективни системски хербициди. По својата хемиска структура фенмедифам и десмедифам претставуваат бис-карбамати (деривати на карбаминска киселина), а етофумесат е дериват на бензофуранот (*Tomlin*, 1997).

Според декларираните податоци, концентрацијата на активните супстанции во пестицидната формулација Inter Of изнеува: 91 g/L $\pm$ 9 g/L за фенмедифам, 71 g/L $\pm$ 7 g/L за десмедифам и 112 g/L $\pm$ 7 g/L за етофумесат.

Во литературата се сретнуваат аналитички методи за определување на фенмедифам, десмедифам и етофумесат, поединечно или во смеса со други компоненти.

Активната супстанца фенмедифам може да се определи со помош на HPLC (High-Performance Liquid Chromatography, високоефикасна течна хроматографија) или пак со титрација, а нејзините остатоци може да се определат со помош на GLC (Gas-Liquid Chromatography, гасно-течна хроматографија). Остатоците од оваа активна супстанца во почвата може да се определат со помош на неколку различни методи како што се: колориметрија, високоефикасна течна хроматографија или гасно-течна хроматографија со детектор со електронски зафат (ECD, Electrone Capture Detector) (*Tomlin*, 1997).

Со примена на методите на високоефикасната течна хроматографија и колориметријата може да се определи и активната супстанца десмедифам, а нејзините остатоци може да се определат со користење на високоефикасна течна хроматографија или гасно-течна хроматографија (*Tomlin*, 1997).

Определување на активната супстанца етофумесат и нејзините остатоци може да се изврши со помош на гасно-течна хроматографија со пламен-фотометриски детектор (FPD, Flame Photometric Detector) (*Tomlin*, 1997).

Според референтните методи предложени од CIPAC (Collaborative International Pesticides Analytical Council) се поставени аналитички методи за поединечно определување на активните компоненти фенмедифам и етофумесат, додека во AOAC (Association of Official Analytical

Chemists) не се сретнуваат стандардни методи за определување на овие активни компоненти.

Референтниот CIPAC метод за определување на фенмедирам, во технички препарати и во емулзиони концентрати, се базира на реверзно-фазна течна хроматографија (RP-HPLC, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography), со примена на ултравиолетова (UV, Ultraviolet) детекција на 238 nm и бутил бензоат како внатрешен стандард. Како стационарна фаза се препорачува употреба на аналитичка колона од типот Waters Bondapak C-18, со големина на честички од 10 μm (или еквивалентна колона), а како мобилна фаза смеса од 480 mL ацетонитрил, 520 mL вода и 10 mL диоксан. За определување на оваа активна супстанца во технички препарат може да се употреби и титриметриски метод (CIPAC, 1985).

Аналитичкиот метод за определување на етофумесат во технички, ЕС и SC (Suspension Concentrate, концентрат за суспензија) пестицидни формулации се изведува со помош на RP-HPLC со UV детекција на 225 nm. За овој метод се препорачува користење на аналитичка колона од типот ODS-3 (150 mm x 4,6 mm; 5 μm) и етил бензоат како внатрешен стандард. Мобилната фаза е составена од 575 mL дејонизирана вода, 325 mL ацетонитрил, 100 mL тетраhydroфуран и е регулирана до pH 4 ($\pm 0,1$) со помош на лимонска киселина (CIPAC, 2000).

Производителот на пестицидната формулација Inter Of има предложено методи за одделно определување на трите активни супстанции во пестицидната формулација. Досега е разработен само еден метод од страна на Krongaard и соработниците за истовремено определување на овие компоненти во пестицидните формулации што се сретнуваат на пазарот во Данска, како што се Betanal optima SC и Kemifam Pro SC (Krongaard et al., 2003). Хроматографскиот процес е извршен со употреба на аналитичка колона од типот Prodigy ODS (250 mm x 4,6 mm; 5 μm), при константна температура на колоната од 20 $^{\circ}\text{C}$ и UV детекција на 225 nm. Како мобилна фаза е користена смеса од метанол и вода, со волуменски однос 65:35 и проток од 1

mL/min. Основните стандардни раствори се подготвени со растворање на пробите во метанолен раствор на оцетна киселина со концентрација 0,05 mol/L, а работните раствори се добиени со разредување на основните раствори со помош на мобилната фаза (смеса на метанол/вода со волуменски однос 65/35). Под наведените експериментални услови ретенциското време на компонентите изнесува околу 7,3 min за десмедирам; 7,9 min за фенмедирам и 9,2 min за етофумесат.

Од овие причини целта на истражувањето на овој труд е разработка на релативно брзи, едноставни, прецизни и точни HPLC методи за истовремено определување на содржината на активните компоненти фенмедирам, десмедирам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на реверзно-фазна течна хроматографија.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

Реагенси: При разработка на методите за определување на фенмедирам, десмедирам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of со помош на високоефикасна течна хроматографија, се користени мобилни фази составени од растворувачи со HPLC чистота (HPLC grade) како: ацетонитрил (CH_3CN), метанол (CH_3OH) и тетраhydroфуран (THF), производени од Sigma Aldrich (Deisenhoven, Germany) и вода, добиена со дестилација на дејонизирана вода низ специјална стаклена апаратура.

За приготвување на пуферските раствори се употребени: фосфорна киселина (H_3PO_4), калиум хидрогенфосфат (K_2HPO_4), калиум дихидрогенфосфат (KH_2PO_4), триетиламин (TEA), оцетна киселина (CH_3COOH) и натриум ацетат (CH_3COONa), производство на Sigma Aldrich. За определување на нултото време на колоната, при реверзно-фазен режим на хроматографирање е користен натриум нитрат (NaNO_3), произведен во Алкалоид (Р. Македонија). Аналитичките стандарди од фенмедирам (99,6 %), десмедирам (99,7 %) и етофумесат (99,9 %) се производство на Bayer (Germany), а пестицидната формулација Inter Of е добиена како подарок од фирмата Хербос (Осиек,

Хрватска), преку генералниот застапник за Македонија, Хербос од Скопје.

HPLC анализа: Разработката на методите за раздвојување и определување на активните компоненти во пестицидната формулација Inter Of е извршена на течен хроматограф, произведен од Perkin Elmer, опремен со бинарна пумпа (модел LC 250) и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV/DAD), модел LC 235 (Perkin Elmer). За обработка на податоците добиени при хроматографскиот процес е користен софтверски пакет OMEGA, верзија 2,35 (Perkin Elmer).

Основните стандардни раствори од активните компоненти, растворите од пробите на пестицидната формулација, како и користените мобилни фази, пред употребата се дегазирани во ултразвучна бања од типот „Elma“. Растворите од пробите, при реверзно-фазен режим на хроматографирање, се филтрирани со помош на Spartan-T шприц-филтри, со големина на пори од 0,45 μm (Sigma Aldrich).

Мерењето на pH вредностите на користените пуферски раствори е извршено со pH - метар, произведен од фирмата Radiometer (Copenhagen).

За разработка на хроматографските методи за раздвојување и определување на активните компоненти фенмедирам, десмедирам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of се користени повеќе типови на аналитички колони со различни димензии и големина на честички. Имено, употребени се брзи (HS, High-Speed) колони од типот: HS 3 $\times$ 3 C-18 (3,3 cm $\times$ 0,46 cm; 3 μm) и HS 3 $\times$ 3 C-8 (3,3 cm $\times$ 0,46 cm; 3 μm) производи на Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA), како и долгите колони од типот: Hypersil ODS (25 cm $\times$ 0,46 cm; 5 μm) на Sigma-Aldrich, LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm $\times$ 0,4 cm; 5 μm), LiChrospher 60 RP-select B (25 cm $\times$ 0,4 cm; 5 μm), LiChrosorb RP-18 (25 cm $\times$ 0,4 cm; 5 μm) и Chromolith Performance RP-18e (10 cm $\times$ 0,46 cm), произведени од Merck.

За одржување на константна температура во колоната, во текот на хроматографскиот процес, користена е термостатирана печка Spark Holland „Mistral“ (тип 880).

Подготовка на основни стандардни раствори од активните компоненти:

Основните стандардни раствори што се користени при разработката на методите за реверзно-фазна течна хроматографија се приготвени со растворање на 0,0202 g, 0,0195 g и 0,1015 g од аналитичките стандарди фенмедирам, десмедирам и етофумесат, соодветно, со метанол во одмерни тиквички од 25 mL. За да се изврши подобро растворање на активните компоненти, подготвените стандардни раствори се ултрасонифицирани во ултразвучна бања во времетраење од 15 минути. Според принципите на SOP's (standard operating procedure) (*Training Manual*, 1995), стандардните раствори се чувани во фрижидер на температура од 4 °C. Под овие услови стабилноста на активните компоненти е поголема од два месеца.

Основните стандардни раствори се употребени за подготовка на работни стандардни раствори што се користени во текот на испитувањата.

Работни стандардни раствори од активните компоненти: Во текот на испитувањата се употребени работни стандардни раствори (смеса од трите активни компоненти), коишто се приготвени со разредување на основните стандардни раствори во тиквички од 10 mL. Во зависност од употребената мобилна фаза тиквичките се дополнети со смеса од ацетонитрил/вода, ацетонитрил/пуфер, метанол/вода или метанол/пуфер со волуменски однос 50/50. Од експерименталните податоци добиени од хроматографските определувања на серијата работни раствори со различна маса, тестирана е зависноста на површината и висината на хроматографските пикови од масата на активната компонента, при што се добиени стандардните калибрациски криви. Серијата на стандардните работни раствори е подготвена со земање на 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 и 2,4 mL од основниот стандарден раствор на секоја активна компонента во одмерни тиквички од 10 mL. Тиквичките се дополнети со смеса од метанол/вода со волуменски однос 50/50. Од секој работен раствор е инјектирано по три пати, со волумен од 10 μL .

Подготовка на проби за квантитативно определување на активните компоненти: За квантитативно определување на активните компоненти феномедифам, десмедифам и етофумесат во пестицидната формулација Inter Of измерени се две проби со маса 0,2608 g и 0,4030 g во одмерни тиквички од 25 mL. Пробите се растворени со метанол, а потоа се третирани со ултразвук во времетраење од 20 минути. Од овие раствори се префрлени порции со волумен од 1 mL во одмерни тиквички од 10 mL и дополнети до марката со смеса од метанол/вода со волуменски однос 50/50. Пред инјектирање (три пати по 10 μ L) растворите се филтрирани низ 0,45 μ m Spartan-T шприц-филтри.

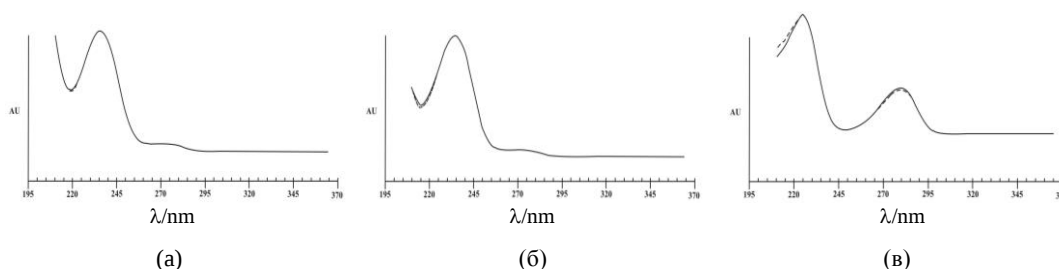
Подготовка на проби за определување на точност на методот: За определување на точноста на методот земени се по 1 mL од двете растворени проби и префрлени во тиквички од 10 mL. Во секој раствор е додадено познато количество од секој аналитички стандард (32,4 μ g/mL и 64,8 μ g/mL од феномедифам, 31,2 μ g/mL и 62,4 μ g/mL од десмедифам и 162,4 μ g/mL и

324,8 μ g/mL од етофумесат). Потоа, тиквичките се дополнети до марката со смеса од еднакви волумени на метанол и вода. Од секој раствор се инјектирани по три порции со волумен од 10 mL. Пред инјектирање растворите се филтрирани низ 0,45 μ m Spartan-T шприц-филтри.

Резултати и дискусија

Изборот на брановата должина на којашто се изведени хроматографските анализи е направен врз основа на UV спектрите на трите активни компоненти.

Од UV спектрите снимени во раствор на метанол и вода, со волуменски однос 60/40 се забележуваат ленти чиишто максимуми лежат на бранова должина од 235 nm за феномедифам (Сл. 1а) и десмедифам (Сл. 1б), и 225 nm за етофумесат (Сл. 1в). Од овие причини HPLC анализата за истовремено определување на активните компоненти во пестицидната формулација Inter Of, со реверзно-фазен режим на елуирање, е изведена на бранова должина од 230 nm.



Сл. 1. Препокриени UV спектри на феномедифам (а), десмедифам (б) и етофумесат (в) од хроматографските сигнали на аналитичкиот стандард и на пестицидната формулација Inter Of, снимени во раствор на метанол/вода, со волуменски однос 60/40

Хроматографскиот процес е воден со примена на изократско елуирање, односно со употреба на константен состав на мобилната фаза.

Со цел да се утврди дали растворувачот влијае на формата на хроматографскиот пик, стандардите се растворени во чист метанол, односно ацетонитрил. При тоа е забележано дека изгледот на пикот не зависи од типот на употребените растворувачи.

Со користење на колона од типот Hypersil ODS (25 cm x 0,46 cm; 5 μ m), мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода (70/30, 50/50, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25 $^{\circ}$ C, UV детекција на 230

nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE од аналитичките стандарди на трите активни компоненти се добиваат „расцепени“ хроматографски пикови, а ретенциското време на феномедифам и десмедифам е идентично. Со примена на мобилна фаза составена од метанол/вода (60/40, V/V), проток од 1 mL/min и константна температура на колоната од 20 $^{\circ}$ C, хроматографските пикови на сите три активни супстанции покажуваат десна асиметрија, а супстанците десмедифам и феномедифам се нецелосно раздвоени.

Врз основа на добиените резултати од испитувањата извршени на колоната од типот HS 3 x 3 C-18 (3,3 cm x 0,46 cm; 3

µm) може да се констатира дека таа не е ефикасна за раздвојување на испитуваните супстанции од нивната смеса.

Кога хроматографскиот процес се одвива на колоната од типот HS 3 × 3 C-8 (3,3 cm x 0,46 cm; 3 µm) со мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода или метанол/вода со различен волуменски однос, добро хроматографско раздвојување е постигнато само за компонентата етофумесат.

Испитувањата извршени на колона од типот LiChrospher 100 RP-18 (25 cm x 0,4 cm; 5 µm) покажуваат дека со употреба на мобилна фаза составена од метанол/вода со различен волуменски однос од 60/40 до 40/60 се добиени симетрични и остри хроматографски пикови од трите активни компоненти со ретенциско време 5,45 min за десмедифам и фенмедифам, а 5,68 min за етофумесат.

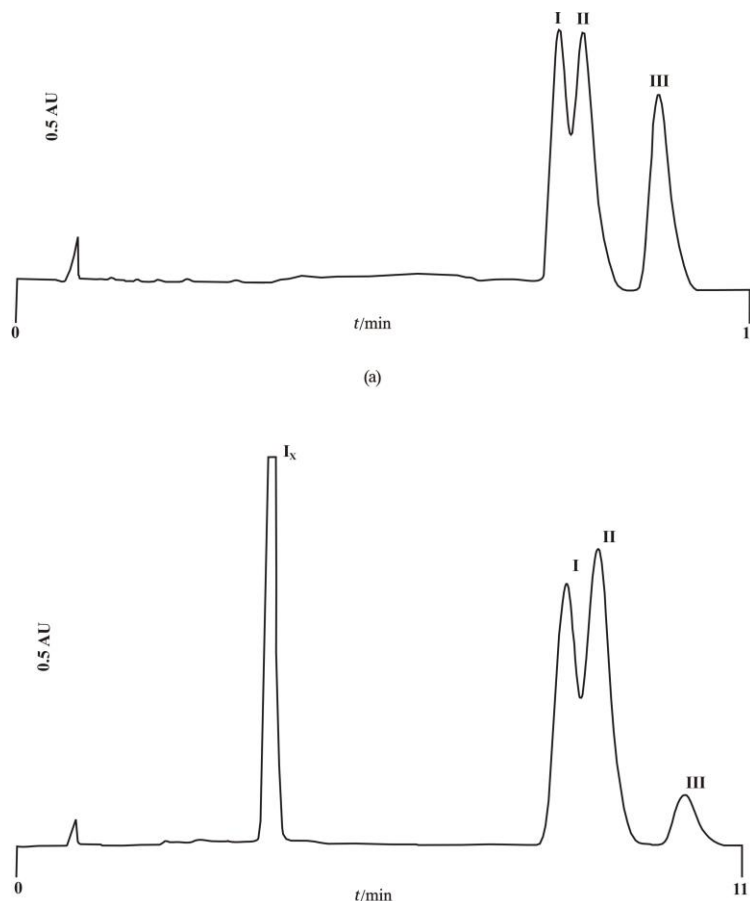
Со примена на стационарна фаза од типот Chromolith Performance RP-18e (10 cm x 0,46 cm) и мобилна фаза составена од ацетонитрил/вода со различен волуменски удел и различен проток не е постигнато раздвојување на фенмедифам и десмедифам, а хроматографски пикови од трите активни компоненти имаат десна асиметрија. Со употреба на мобилна фаза составена од еднакви волумени на метанол и вода, проток од 2 mL/min и температура на колоната на 40 °C се добиени несиметрични и широки хроматографски пикови со уште поголема асиметрија од активните компоненти десмедифам и

фенмедифам, а пикот од етофумесат е многу широк и развлечен.

Со употреба на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (12,5 cm x 0,4 cm; 5 µm), мобилна фаза составена од метанол/вода (45/55, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25 °C, UV детекција на 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE, ретенциските времиња на анализите изнесуваат: 10,39 min (десмедифам), 11,05 min (фенмедифам) и 12,98 min (етофумесат).

Најдобро раздвојување на активните компоненти со примена на реверзно-фазен режим на хроматографирање е постигнато со примена на аналитичка колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 µm), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на бранова должина од 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 AE.

При овие хроматографски услови е добиена мирна базна линија, без шумови, а пиковите на трите активни супстанции се остри, симетрични и релативно доволно раздвоени за да може квантитативно да се определат (Сл. 2). Во хроматограмот добиен од пестицидната формулација Inter Of (Сл. 2 б), при овие експериментални услови се појавува еден коелуирачки пик, означен со I_x, којшто веројатно потекнува од некоја непозната супстанца присутна во пестицидната формулација.



Сл. 2. Хроматограми на десмедирам (I), фенмедирам (II) и етофумесат (III) добиени од нивната стандардна смеса (а) и од пестицидната формулација Inter Of (б) на колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 μ m), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 $^{\circ}$ C и UV детекција на 230 nm

Специфичноста и селективноста на методот се проценети со идентификација на пикот од интерес и добиената вредност за индексот на чистота. Идентитетот на анализот е потврден со прекривање на апсорпциските спектри на чистиот аналитички стандард од активната супстанца и апсорпцискиот спектар на истата супстанца во пестицидната формулација (Jenkie, 1996).

Со споредба на UV спектрите на хроматографските пикови од фенмедирам, десмедирам и етофумесат од аналитичките стандарди и пестицидната формулација Inter Of, добиени се вредности за индексот на чистота коишто изнесуваат 1,1 за фенмедирам (Сл. 1а) и десмедирам (Сл. 1б) и 1,2 за етофумесат (Сл. 1в).

Нултото време на колоната е определено со помош на раствор од NaNO_3 , којшто е додаван во работните раствори од стандардната смеса и од пестицидната

формулација и при овие хроматографски услови изнесува 1,55 min.

Добиените вредности за ретенциското време изнесуваат: 7,89 min за десмедирам, 8,58 min за фенмедирам и 9,75 min за етофумесат, а пресметаните вредности за сепарациониот фактор на соседните пикови се: $\alpha_{I,II} = 1,11$ (за десмедирам и фенмедирам) и $\alpha_{II,III} = 1,17$ (за фенмедирам и етофумесат).

Интермедијарната прецизност на методот од тридневните анализи во коишто се направени по осум сукцесивни инјектирања на аналитичките стандарди со маса од 1,296 μ g (или 129,6 μ g/mL) за фенмедирам, 1,248 μ g (или 124,8 μ g/mL) за десмедирам и 6,496 μ g (или 649,6 μ g/mL) за етофумесат е проценета со помош на добиените параметри од анализата на варијанца (ANOVA, Analysis of Variance).

Врз основа на прикажаните вредности за статистичките критериуми, може да се констатира дека интермедијарната прецизност на разработениот метод при дефинираните хроматографски услови на работа, покажува задоволителни резултати во однос на ретенциските времиња и површината под пиковите.

Типот на зависноста помеѓу масата на активната компонента и површината под пиковите, или масата на активната компонента и висината на добиените хроматографски пикови е тестирана во граници од 0,162 µg до 1,944 µg (16,2 µg/mL - 194,4 µg/mL) за фенмедифам, од 0,156 µg до 1,872 µg (15,6 µg/mL - 187,2 µg/mL) за десмедифам и од 0,812 µg до 9,744 µg (81,2 µg/mL - 974,4 µg/mL) за етофумесат. При тоа, за сите три активни компоненти е утврдена линеарна зависност на масата на аналитот од површината под пиковите и висините на пиковите во целото испитувано концентрациско подрачје, што може да се види од добиените вредности за коефициентите на детерминација: 0,9995 за фенмедифам; 0,9990 за десмедифам и 0,9998 за етофумесат.

Вредноста за долната граница на детекција (LOD) е определена со осетливост на детекторот од 0,05 АЕ и изнесува: 62,47 ng за фенмедифам, 59,02 ng за десмедифам и 412,84 ng за етофумесат. Вредностите за долната граница на квантификација (LOQ) изнесуваат: 208,24 ng (фенмедифам), 196,73 ng (десмедифам) и 1,38 µg (етофумесат).

Според пресметаните вредности за аналитичкиот принос (од 95,56 % до 101,12 %, RSD = 0,21 % - 2,27 %, $n = 3$) може да се констатира дека методот се одликува со точност којашто може да даде задоволителни резултати при квантитативното определувањето на трите активни компоненти во пестицидната формулација Inter Of.

Средните вредности за концентрациите на активните компоненти во пробите од пестицидната формулација Inter Of, добиени со предложениот метод изнесуваат: 90,2383 g/L ($n = 6$, RSD = 0,44 %) за фенмедифам, 70,3894 g/L ($n = 6$, RSD = 1,78 %) за десмедифам и 113,2087 g/L ($n = 6$, RSD = 1,47 %) за етофумесат и истите одговараат на вредностите декларираны од производителот.

Заклучок

Со примена на реверзно-фазна високоефикасна течна хроматографија е разработен прецизен и точен метод за определување на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во препаратот Inter Of. Истражувањата покажаа дека најдобри резултати се постигнати со помош на аналитичката колона од типот LiChrospher 60 RP-select B (25 cm x 0,4 cm; 5 µm), мобилна фаза составена од метанол и вода (60/40, V/V), проток 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C, UV детекција на бранова должина од 230 nm и осетливост на детекторот од 0,5 АЕ. Потребното време за анализа е околу 11 min.

Литература

1. Постоловски М., Пејчиновски Ф., Костов Т., Накова Роза. 2000. Преглед на пестицидите регистрирани во Република Македонија. Министерство за земјоделство, шумарство и водостопанство и Здружение за заштита на растенијата на Република Македонија, 351-353, 406.
2. Janjić V. 2005. Fitofarmacija. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, 23-24, 34-48, 369-370, 631-650.
3. Deveikyte I., Seibutis V. 2006. Broadleaf weeds and sugar beet response to phenmedipham, desmedipham, ethofumesate and triflurosulfuron-methyl. *Agronomy Research* 4 (Special issue), 159-162.
4. Tomlin C. 1997. The Pesticide Manual Incorporating the Agrochemicals Handbook. 11 th Edition. Crop Protection Publications, 291-292, 410-411, 787-788.
5. CIPAC Method Handbook C (Phenmedipham). 1985. 77/TC/M/3.2, 2181-2186.
6. CIPAC Method Handbook J (Ethofumesate). 2000. 233/TC/M/3, 43-50.
7. Krøngaard T., Petersen K. K., Christoffersen C. 2003. Control of Pesticides 2002. National Environmental Research Institute. Ministry of the Environment.
8. Training Manual for Pesticide Residue Analysis. 1995. Natural Resources Institute, Vol. 2, B-5; B-24.

11. Jenkie D. R. 1996. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. I General Concepts and Guidelines. J. Liq. Chromatogr. Related Technol. **19** (5), 737-757.

ВЛИЈАНИЕ НА АМБАЛАЖНИОТ МАТЕРИЈАЛ ВРЗ КВАЛИТЕТОТ И БЕЗБЕДНОСТА НА ПРЕХРАНБЕНИТЕ ПРОИЗВОДИ

¹Тања Силјановска, ²Мирјана С. Јанкуловска, ²Ленче Велкоска – Марковска, ²Билјана Петановска – Илиевска

Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет Св. „Кирил и Методиј“ Скопје, Република Македонија

E-mail: jankulovska_m@yahoo.com

Апстракт

Полиетилен терефталат (ПЕТ) е често користен материјал за пакување на различни прехранбени производи, особено газирани пијалаци и флаширана вода. Цврстината и бариерните својства на ПЕТ се погодни за пакување на пијалаци особено поради неговата отпорност на хемикалии и високиот степен на транспарентност. Формалдехидот и ацеталдехидот се формираат во текот на термоформовањето на садовите од ПЕТ. По ладењето, формалдехидот и ацеталдехидот остануваат заробени во сидовите на ПЕТ амбалажата и може да мигрираат во водата за пиење по нивното полнење и во текот на складирањето. Земајќи го сето ова предвид целта на ова истражување е да се определи концентрацијата на формалдехид и ацеталдехид во ПЕТ амбалажа со различна големина, направена од различни производители на шишиња за минерална газирани и не газирани вода, изложени на различна температура. Концентрацијата на на формалдехид и ацеталдехид кои мигрираат од шишињата во кои има минералната газирани и негазирани вода е определна со примена на високоефикасна течна хроматографија. Имајќи во предвид дека формалдехидот и ацеталдехидот немаат УВ активни или флуоресцентни групи, пред хроматографското определување се изведува дериватизација во затворен систем (поради ниската температура на вриење на формалдехидот и ацеталдехидот), пришто карбонилните соединенија се претвораат во УВ активни соединенија.

Клучни зборови: полиетилен терефталат, формалдехид, ацеталдехид, миграција, високоефикасна течна хроматографија.

INFLUENCE OF PACKAGING MATERIAL ON QUALITY AND SAFETY OF FOOD PRODUCTS

Tanja Siljanovska, Mirjana S. Jankulovska*, Lenche Velkoska-Markovska, Biljana Petanovska-Ilievska

Faculty of Agricultural Sciences and Food, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, Republic of Macedonia

*e-mail: jankulovska_m@yahoo.com; jankulovska@zf.ukim.edu.mk

Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is the main packaging material for many food products, particularly carbonated beverages and bottled water. The strength and permeability properties of PET are very good for packaging of beverages, its resistance to chemicals is high and it has a high degree of transparency. Acetaldehyde and formaldehyde are formed during the thermoforming of PET containers. After cooling, acetaldehyde and formaldehyde remain trapped in the walls of a PET bottle and may migrate into the water after filling and storage. Taking into consideration all this, the objective of this investigation is determination the concentration of acetaldehyde and formaldehyde in PET containers of different volumes, made by various manufacturers of bottled mineral carbonated and noncarbonated water, and exposed to different temperatures. The migration of acetaldehyde and formaldehyde from PET bottles into mineral carbonated and noncarbonated water was determined by high performance liquid chromatography. Taking into consideration that formaldehyde and acetaldehyde have no UV active or fluorescent group, the chromatography was preceded by

derivatization in a closed system (due to a low boiling point of acetaldehyde and formaldehyde), which transforms carbonyl compounds into UV active compounds.

Key words: polyethylene terephthalate, formaldehyde, acetaldehyde, migration, high performance liquid chromatography.

Вовед

Пакувањето е од голема корист, бидејќи на тој начин храната се заштитува од надворешните агенсии како што се штетници, непосакувани мириси, микроорганизми, светлина и кислород коишто доведуваат до нејзино расипување. Сепак, тоа може да биде извор на хемиска контаминација на храната, па поради тоа има негативно влијание врз квалитетот и безбедноста на храната (Inoue, 2001). Поради оваа причина миграцијата на компонентите од пакувањето и другите материјали коишто доаѓаат во контакт со храната се проучуваат, разгледуваат и контролираат (Barnes, 2007).

Храната стапува во контакт со материјалот за пакување во речиси секоја фаза на производството, како и при транспортот, складирањето, подготовката и консумирањето. Тоа се однесува на материјали коишто се користат за производство на садови за складирање, подвижни ленти, цевки, површини за подготовка на храна, како и за прибор за готвење и јадење (Audic, 2003). Храната и пијалците може да предизвикаат силна реакција со материјалот со којшто стапуваат во контакт и се означуваат како “агресивни”. Киселата храна може да предизвика корозија на металното пакување при контакт и премин на металите во неа. Пијалците можат да ја дезинтегрираат незаштитената хартиена и картонска амбалажа. Всушност, кога не се во контакт со храната материјалите се целосно инертни, но кога храната е пакувана хемиските состојки може да мигрираат во пакуваната храна. Металите, стаклото, керамиката, пластиката, гумата и хартијата при контакт со храната под одредени услови особудуваат извесни количества од составните компоненти (Ehlert, 2008). Преносот на хемиски загадувачи од амбалажата во храната како резултат на директен контакт помеѓу нив се нарекува миграција (Katan, 1996). Разликуваме два вида миграција, вкупна миграција (вкупната вредност на сите компоненти коишто од амбалажата

преминуваат во храната) и специфична миграција (поединечна вредност за секоја компонента што мигрира од амбалажата во храната). За хемиска детекција и квантификација на компонентите коишто може да мигрираат се користат специфични методи (спектофотометриски и хроматографски методи) коишто се различни за секое хемиско соединение и се посебно работени или прилагодени за одреден вид храна. При испитување на миграција потребно е да се знаат сите компоненти коишто можат да мигрират од амбалажата во храната (Katan, 2007).

Полиетилен терефталат (PET) поради неговата отпорност и висок степен на транспарентност е најпогоден за пакување на многу прехранбени производи, особено за газирани пијалаци и вода, како и за пакување на производи од хемиската индустрија. PET се добива со реакција на постепена полимеризација на терефтална киселина и етилен гликол. Ацеталдехидот и формалдехидот се добиваат при термоформирање на PET контејнери. По ладењето, ацеталдехидот и формалдехидот остануваат на ѕидовите од шишето и може да мигрираат во водата, откако ќе се наполнат и складираат.

При производство на PET амбалажа, може да се појават ацеталдехидот и формалдехидот како несакани споредни производи во процесот на негово термичко распаѓање. Ако процесот на производство не е строго контролиран во однос на температурата и притисокот во текот на формирање на шишето, или ако чистотата на суровините не е задоволителна може да има присуство на мономери во крајниот производ. Поради високата нестабилност на ацеталдехидот и формалдехидот, постои можност за миграција од шишињата формирани од PET во водата, и како последица на тоа може да дојде до промена во вкусот и мирисот на флашираната вода (Castle, 1989).

За определување на концентрацијата на формалдехид и ацеталдехид се користат спектофотометриски и хроматографски методи (Cristova, 2014).

Со цел да се покаже влијанието на амбалажниот материјал врз квалитетот и безбедноста на прехранбените производи во оваа дипломска работа е даден пример за определување на концентрацијата на ацеталдехидот и формалдехидот коишто може да мигрираат во водата за пиење (газирана и негазирана) пакувана во PET амбалажа (James, 1992). За нивно определување се користат методите на високоефикасна течна хроматографија (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Употребувани се шишиња од 0,33 L и 2 L на различни производители. Шишињата се набавени од локалните продавници, миграцијата на ацеталдехидот и формалдехидот е проценета во однос на времетраењето на складирањето (1 ден, 15 дена, 3 месеци, 6 месеци и 8 месеци) изложеноста на сончева светлина, присуство на јаглерод диоксид и примена на различни полиетиленски капачиња.

Експериментален дел

Подготовка на примерокот

Тестовите за миграција се спроведени на флаширана газирана и негазирана минерална вода пакувана во пластични шишиња со различна маса и волумен (0,33 mL и 2 L), купени од локални продавници, со различен датум на полнење (Redžepović, 2012).

Метод за определување на содржина на ацеталдехид и формалдехид во вода

Начин на работа: 100 mL од примерокот (вода за пиење) е дериватизиран во кисела средина на $\text{pH} = 3$ (6 M HCL) со 6 mL 70 % 2,4 динитрофенил хидразин (DNPH) раствор. Контејнерот веднаш се поставува на грејно тело со магнетна мешалка на температура од 40 °C, 550 вртежи во минута во времетраење од 1 час. Добиените деривати, динитрофенил хидразини, потоа се екстрахирани од растворот со цврсто-фазна екстракција на колона Supelco SPA -

C18 (SPE-C18). Колоната е кондиционирана со 10 mL цитратен пуфер, а потоа примерокот низ којшто претходно се додадени 10 mL натриум хлорид, се пропушта квантитативно во истата. Елуирање на дериватите од SPE-C18 колоната се врши со 8 mL ацетонитрил. Потоа примерокот се префрла во вијала со волумен од 1,5 mL и се анализира со помош на HPLC (Redžepović, 2012).

Валидација на методот

Линеарност: Врз основа на параметрите за линеарност (Табела 1), може да се забележи дека калибрациските криви на формалдехид и ацеталдехид се линеарни при концентрација од 1,5 до 300 $\mu\text{g/L}$ во две калибрациски подрачја и тоа пониско: (1,5-60 $\mu\text{g/L}$), 1,5, 7,5, 15, 30 и 60 $\mu\text{g/L}$ и повисоко: (7,5-300 $\mu\text{g/L}$), 7,5, 15, 75, 150 и 300 $\mu\text{g/L}$ со коефициент на корелација којшто е во согласност со условите на валидација ($> 0,9990$). **Точност и повторливост:** Во 800 mL дестилирана вода се додадени 0,8 mL од стандарден раствор DNPH-формалделхид и DNPH-ацеталдехид со концентрација од 15 $\mu\text{g/mL}$. Измерени се шест проби и е извршено определување на концентрацијата на формалдехид и ацеталдехид во подготвените примероци пришто нивната вредност достигнува 15 $\mu\text{g/mL}$. Релативната стандардна девијација за формалдехид и ацеталдехид (Табела 2) е во согласност со критериумите за валидација ($\text{RSD} \leq 20\%$), за формалдехид изнесува 4,878% а за ацеталдехид 2,604%.

Лимит на детекција и лимит на квантификација: Лимитот на детекција (Limit of detection, LOD) и лимитот на квантификација (LOQ) на методот се дефинирани како трикратна односно, десеткратна вредност на стандардната девијација на резултатите во однос на слепата проба (Табела 3).

Табела 1. Параметри за линеарност на формалдехид (FA) и ацеталдехид (AA)

Аналити	Концентрациско подрачје (µg/L)	Регресиска равенка	R ²
FA	1,5-60	$A = 1,66697345 \cdot x + 0,0618378$	0,99997
AA	1,5-60	$A = 1,00626839 \cdot x - 0,292929327$	0,99993
FA	7,5-300	$A = 1,71464253 \cdot x - 4,2994569$	0,99991
AA	7,5-300	$A = 1,2722231 \cdot x - 3,1696415$	0,99991

Табела 2. Параметри за точност и повторливост на методот за формалдехид (FA) и ацеталдехид (AA)

Параметри за точност и повторливост	FA	AA
Стандардна девијација	0,70	0,396
Релативна стандардна девијација, %	4,878	2,604
Аналитички принос, %	89,24	92,99

Табела 3. Лимит на детекција и лимит на квантификација, во на методот за формалдехид (FA) и ацеталдехид (AA)

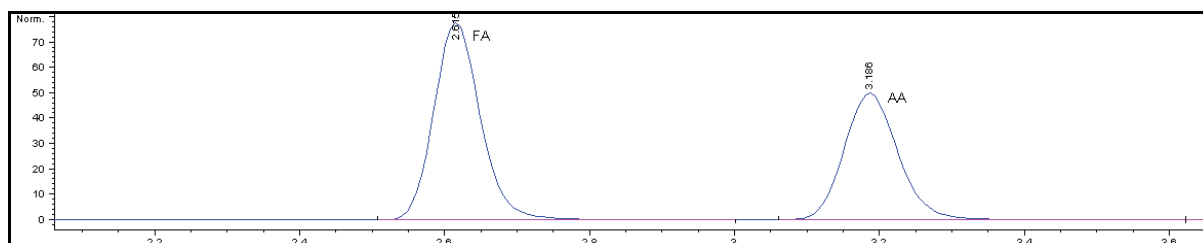
Параметри	FA	AA
Лимит на детекција, LOD (µg/L)	0,3	0,3
Лимит на квантификација, LOQ (µg/L)	1	1

Резултати и дискусија

Миграција на формалдехид и ацеталдехид во минерална вода пакувана во PET

Како што е веќе спомнато, со примена на хроматографски методи може да се определи концентрацијата на карбонилни соединенија (ацеталдехид и формалдехид) коишто може да мигрираат од PET

амбалажа во газирана и негазирана минерална вода. Наведените мигранти можат да предизвикаат хемиски и сензорни промени во пакуваната вода за пиење во PET шишињата (Lazić, 1997). Хроматограмот при дадените експериментални услови (експериментален дел) е даден на слика 1.



Слика 1. Хроматорграм на формалдехид и ацеталдехид

Од слика 1 може да се види дека ретенциското време на формалдехидот изнесува 2,615 min, додека за ацеталдехид изнесува 3,185 min.

За определување на миграцијата на формалдехид и ацеталдехид коишто се сретнуваат во амбалажата на газирана минерална вода се употребувани пластични шишиња со различен волумен (0,33 mL и 2 L). Времето на чување на водата е 24 часа

или три месеци. Во девет PET шишиња од 2 L (примероци од О1-1 до О1-9), минералната вода е чувана еден ден (24 часа). Во PET шишиња од 2 L, примероци А1-1, А1-2 и во PET шишиња од 0,33 L (примероци од Б1-1 до Б1-7), минералната вода е чувана 3 месеци. Добиените резултати се прикажани во следната табела 4:

Табела 4. Концентрација на формалдехид (FA) и ацеталдехид (AA) од PET шишиња во газираната минерална вода; означени со O - минерална вода складирана во PET амбалажа од 2 L за еден ден; означени со A - минерална вода складирана во 2 L PET амбалажа за три месеци; означени со B - минерална вода складирана во 0,33 mL PET шишиња за три месеци (секоја вредност е средна вредност од три мерења)

Примерок	Волумен на водата [L]	Период на чување [денови]	Концентрација [$\mu\text{g/L}$]	
			FA	AA
O1-1	2	1	1,34	1,82
O1-2	2	1	1,45	1,62
O1-3	2	1	1,27	1,78
O1-4	2	1	1,47	2,09
O1-5	2	1	1,28	2,18
O1-6	2	1	1,73	1,99
O1-7	2	1	1,78	2,22
O1-8	2	1	1,55	2,16
O1-9	2	1	1,52	2,22
A1-1	2	90	8,61	13,94
A1-2	2	90	12,38	17,68
B1-1	0,33	90	35,36	60,90
B1-2	0,33	90	35,23	53,57
B1-3	0,33	90	39,17	64,85
B1-4	0,33	90	26,56	59,80
B1-5	0,33	90	22,56	55,86
B1-6	0,33	90	32,03	82,06
B1-7	0,33	90	28,25	78,05

Врз основа на добиените резултати (табела 4) може да се забележи дека по изминувањето на 24 часа, чувањето на минерална вода во пластични шишиња од 2 L (O1-1 до O1-9) резултира со миграција на формалдехид и ацеталдехид во водата. Во секое шише, концентрацијата на формалдехид е секогаш помала во споредба со концентрацијата на ацеталдехид. По тримесечното чување на минерална вода во PET шишиња од 2 L (A1-1 и A1-2) концентрацијата на двата мигранти значително се зголемила. И во овој случај, концентрацијата на формалдехидот е помала во споредба со концентрацијата на ацеталдехид (Redžerović, 2012). Најголема концентрација на ацеталдехид се појавува во минералната вода чувана три месеци во шишиња од 0,33 L (од B1-1 до B1-7). Таа е четири пати поголема од концентрацијата на ацеталдехид во минералната вода којашто исто така, е чувана три месеци во шишиња од 2L (A1-1 и A1-2) и скоро триесет пати поголема од концентрацијата на ацеталдехид во минералната вода чувана еден ден во шишиња од 2L (O1-1 до O1-8). Исто така, концентрацијата на

формалдехид во минералната вода чувана во шишиња од 0,33 L (од B1-1 до B1-7) е околу три до четири пати повисока од концентрацијата на формалдехид во газираната минерална вода чувана три месеци во шишиња од 2 L (A1-1 и A1-2) и околу дваесет и три пати поголема од концентрацијата на формалдехид во газираната минерална вода чувана еден ден во шишиња од 2 L (O1-1 до O1-8).

Фактори кои влијаат на миграцијата

Со цел да се определи кои фактори влијаат на миграцијата испитана е и миграцијата на формалдехид и ацеталдехид во пакувана газирана и негазирана минерална вода од истиот производител во шишиња со различни волумени (0,33 mL и 2 L) и капачиња од полипропилен (Z-1, Z-2 и Z-3) со датум на пакување и услови на чување (атмосферски услови или изложување на сонце пет дена пред анализирањето и температура на воздухот меѓу 20-38 °C). Добиените резултати се прикажани во следната табела 5.

Табела 5. Концентрација на формалдехид (FA) и ацеталдехид (AA) од PET шишињата во негазирана и газирана минерална вода, изложени на различни температури со различно време на чување и затворени со различни полипропиленски капачиња Z-1, Z-2 и Z-3.

Примерок	газираност	капачиња	волумен [L]	денови*	5 дена**	Концентрација $\mu\text{g/L}$	
						FA	AA
C1-1	Не	Z-2	0,33	240	Да	33,33	56,88
C1-2	Не	Z-1	0,33	180	Да	27,17	37,41
C1-3	Не	Z-2	0,33	15	Да	40,33	53,98
C1-4	Не	Z-1	0,33	15	Да	37,69	53,69
C1-5	Да	Z-3	0,33	15	Да	35,14	54,38
C1-6	Да	Z-2	0,33	15	Да	33,13	51,78
C1-7	Да	Z-2	2	240	Не	32,06	56,87
C1-8	Да	Z-2	2	240	Не	30,72	47,88
C1-9	Да	Z-2	0,33	240	Не	35,13	92,98
C1-10	Да	Z-2	0,33	240	Не	35,42	108,82

*период на чување, **изложеност на сончева светлина

Врз основа на податоците од табела 5 може да се забележи дека во едно исто шише концентрацијата на формалдехид во минералната вода е секогаш помала од концентрацијата на ацеталдехид. Ова е во согласност со резултатите од претходните експерименти (табела 5). Концентрацијата на формалдехид е поголема во минералната вода чувана во PET шишиња од 0,33 mL (C1-1, C1-3, C1-4, C1-5, C1-6, C1-8 и C1-10) од концентрацијата во минералната вода чувана во PET шишиња од 2 L (C1-7 и C1-9). Покрај тоа, се забележува дека концентрацијата на формалдехид во газираната минерална вода во шишињата коишто биле пет дена изложени на сонце (C1-3, C1-4 и C1-5) е поголема од концентрацијата во негазираната минерална вода во шишињата (C1-1 и C1-2) коишто исто така биле изложени на сонце. Ова укажува на фактот дека концентрацијата на јаглерод диоксид и УВ зрачењето допринесува за миграцијата на формалдехид и ацеталдехид од PET шишињата во минералната вода, што е во согласност со претходните истражувања. Можно е притисокот што го врши јаглерод диоксидот врз сидовите на PET шишињата да ја поттикнува миграцијата на формалдехид и ацеталдехид од PET шишето (Redžepović, 2012). Неочекувано голема миграција на формалдехид и ацеталдехид е добиена во примероците C1-8 и C1-10 на газирана минерална вода чувана осум месеци во пластични шишиња од 0,33 mL.

Познато е дека формалдехидот и ацеталдехидот можат да мигрираат од полипропиленски капачиња. Од влијанието на различните полипропиленски капачиња (Z-1, Z-2 и Z-3) може да се заклучи дека трите различни полипропиленски капачиња немаат значителен ефект врз миграцијата на формалдехид и ацеталдехид во газираната и негазираната минерална вода (Табела 5).

Заклучок

Амбалажата на храната има многу важна улога во заштита на храната од контаминација, физички и механички оштетувања, зачувување на нејзиниот квалитет и безбедност и продолжување на рокот на траење. Со развојот на прехранбената индустрија се одвива и паралелно развојот на материјалите за пакување, при што се добиени голем број различни и комплексни материјали со карактеристични својства коишто се користат самостојно или во комбинација со други материјали во зависност од потребите.

Поради широкиот спектар на материјали за пакување, многу е важно добро да се испитаат својствата на секој материјал, што е клучно за да може да се одреди правилно соодветната намена на секој материјал. При неправилен избор и при неправилна употреба, овие материјали можат да бидат сериозен извор на контаминација на храната.

Пластичната амбалажа содржи молекули со помали молекулски маси, мономер и олигомери, како и адитиви (полнила, УВ стабилизатори, антистатички агенси итн.). Полимерните адитиви и останатите делови на мономерите и олигомерите не се хемиски поврзани со молекулата на полимерот, што им овозможува да се движат слободно во внатрешноста на полимерот. Од таа причина, важно е да се одредат потенцијалните мигранти и нивните токсични ефекти врз здравјето на потрошувачите.

Формалделхид и ацеталделхид се појавуваат како резултат на деградација на полиетилен терефталат и се присутни на сидовите од пластиката. Меѓутоа, тие може да се одржат во пластичните шишиња во многу мали количества во текот на производните процеси контролирајќи ги критичните фази во производствениот процес.

Миграцијата на формалделхид и ацеталделхид од пластичните шишиња во флашираната вода се зголемува со текот на времето.

Миграцијата на ацеталделхид од пластично шише во флаширана вода е значително поголема од миграцијата на формалделхид.

Концентрацијата на формалделхид е поголема во минералната вода чувана во PET шишиња од 0,33 mL од концентрацијата во минералната вода чувана во PET шишиња од 2 L.

Концентрацијата на формалделхид во газираниот минерална вода во шишињата коишто биле пет дена изложени на сонце е поголема од концентрацијата во негазираната минерална вода во шишињата коишто, исто така биле изложени на сонце.

Концентрацијата на јаглерод диоксид и УВ зрачењето допринесува за миграцијата на формалделхид и ацеталделхид од PET шишињата во минералната вода.

Во сите случаи концентрацијата на формалделхид и ацеталделхид е секогаш помала од дозволената миграција од пластичната амбалажа.

Литература

1. Barnes K. A., Sinclair C. R., Watson D. H., (2007), Chemical migration and food contact materials, 434, Cambridge.

2. Castle L., Mayo A., Crews C., Gilbert J., (1989), Migration of poly(ethylene terephthalate) (PET) oligomers from PET plastics into foods during microwave and conventional oven cooking and into bottled beverages, *Journal of Food Protection*, 337–338, USA.
3. Ehlert, K. A., Beumer, C. W. E., Groot, M. C. E., (2008), Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Addit Contam*, 25(7): 904–910.
4. Inoue K., Horie M., (2001), Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and food, 64-65, Japan.
5. Jean-Luc Audic, Reyx D., Jean-Calude Brosse, (2003), Migration of additives from food grade polyvinyl chloride films: Effect of plasticization by polymeric modifiers instead of conventional plasticizers, *Journal of Applied Science*, France.
6. James W. Eichelberger, Bashe W. J., (1992) Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenylhydrazine derivatization and high performance liquid chromatography, EPA Method 554.
7. Katan L. L., Leonard L. Katan, (1996), Migration from Food Contact Materials Black Academic & Professional, UK.
8. Karen A. Barnes, C. Richard Sinclair, Watson D.H., (2007), Chemical migration and food contact materials, Woodhead Publishing, UK.
9. Redžepović A. S., Ačanskić M. M., Vujić D. N., Lazić V. L., (2012), Determination of Carbonyl compounds (acetaldehyde and formaldehyde) in polyethylene terephthalate containers designated for water conservation, Faculty of Technology, Serbia.
10. Cristova-Bagdassarian V. L., Tishkova J. A., Georgieva V., (2014), Health Risks Associated with PET Bottled Mineral Waters and Beverages: Overview, Analysis and Evaluation, Bulgaria.
11. Lazić V., Curaković M., Gvozdenović J., Vujković I., (1997), Health Aspect of Food Packaging, The World of Plastics and Rubber, 10-11, Novi Sad.

ВЛИЈАНИЕ НА АМБАЛАЖАТА ВРЗ РОКОТ НА ТРАЕЊЕ НА ПРЕХРАНБЕНИТЕ ПРОИЗВОДИ

Даниела Димовска, Мирјана С. Јанкуловска*, Ленче Велкоска – Марковска, Биљана Петановска
– Илиевска

Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет Св. „Кирил и Методиј“ Скопје, Република
Македонија

*e-mail: jankulovska_m@yahoo.com

Апстракт

Рокот на траење на храната е всушност временски период во кој производот се смета соодветен за консумирање. Со разбирањето на факторите коишто се особено важни за рокот на траење на производот, можно е манипулирање на овие фактори со цел да се продолжи рокот на траење на тој производ. Постојат повеќе фактори кои влијаат на рокот на траење како што се: преработката на производот, замрзнувањето, хемиските промени, а исто така и пакувањето на храната може да придонесе за намалувањето на количината на храна којашто се фрла заради краткиот рок на употреба. Постои научна основа за оценување на рокот на траење со помош на математички изрази коишто се корисни во предвидување на разградувањето на прехранбените производи за време на чувањето. Таа се базира на принципите на хемиската кинетика. Всушност, се испитуваат промените во квалитетот (Q) кои се следат и се мерат со текот на времето. Рокот на траење на прехранбениот производ врз основа на промените на квалитетот во однос на времето може да ја следи кинетика од нулти ред или од прв ред. Со помош на ове пресметки може да се предвидат фазите на намалување на квалитетот и на исправноста на производот.

Клучни зборови: амбалажа, рок на траење, хемиска кинетика, реакции од нулти ред, реакции од прв ред

INFLUENCE OF PACKAGING ON THE SHELF LIFE OF FOOD PRODUCTS

Daniela Dimovska, Mirjana S. Jankulovska*, Lenche Velkoska-Markovska, Biljana Petanovska-
Ilievskaa

Faculty of Agricultural Sciences and Food, Ss. Cyril and Methodius University, Skopje, Republic of
Macedonia

*e-mail: jankulovska_m@yahoo.com; jankulovska@zf.ukim.edu.mk

Abstract

The shelf life of the food was actually period in which the product is considered suitable for consumption. By understanding the factors that influence the shelf life of the product, it is possible manipulation of these factors in order to extend the shelf life of the product. There are several factors that affect the shelf life such as: the manufacture of the product, freezing, chemical changes, as well as, food packaging. These factors can contribute to reducing the amount of food that is thrown away because of the short shelf life. There is scientific basis for assessing the shelf life using mathematical expressions that are useful in predicting the degradation of food products during storage. It is based on the principles of chemical kinetics. Actually, the changes in the quality (Q) can be observed and measured over time. The shelf life of the food products based on changes in quality in relation to the time can follow kinetics of zero order or first order. Using these calculations the phases of reducing the quality and accuracy of the product can be predicted.

Keywords: packaging, shelf life, chemical kinetics, zero-order reactions, first-order reactions

Вовед

За да можеме да ги зачуваме прехранбените производи подолг временски период во исправна состојба неопходно е да се направи соодветен избор на амбалажниот материјал. Изборот на амбалажата се прави врз основа на физичката и хемиската природа на производот. За таа цел, треба да се земат предвид физичките својства на производот како што се вкус, мирис, изглед, специфична топлина, коефициент на ширење и други. Исто така, не треба да се изостават и хемиските својства на производот како содржина на ароматични материји, содржина на вода, присуство на гасови и друго.

Доколку направиме споредба помеѓу минатото и сегашноста ќе дојдеме до заклучок дека пакувањето на храната било разновидно, секако почнувајќи од наједноставната форма на амбалажен материјал па сè до современи материјали коишто во рамки на својот капацитет не само што ја штитат храната од надворешни влијанија, туку и овозможуваат на самиот потрошувач да биде во тек со моменталната состојба на продуктот. Во минатото најчесто биле употребувани трска, треви и животински делови. Со текот на времето се откриле и рудите, металите и другите хемиски соединенија. Единствената функција на амбалажните материјали во тој временски период била да се заштити храната. Во денешно време како амбалажен материјал се користи дрво, метал, хартија, пластични маси, стакло, биополимери и разновидни комбинации на веќе споменатите материјали. Целта не е само заштита на храната, туку и продолжување на рокот на траење на производот, информирање на потрошувачот за состојбата на производот, маркетинг и друго. Денешна тенденција на секој производител е да искористи поефтин амбалажен материјал којшто ќе овозможи да се исполнат сите параметри, а тоа е причина за создавањето на комбинирани амбалажни материјали коишто во денешно време се многу експонирани. Со цел да се постигне подолг рок на траење на

прехранбените производи истражувањата одат во насока на изнаоѓање на современи начини со кои тоа ќе се постигне. Во современи начини на пакување на храна спаѓаат пакување во модифицирана атмосфера на гасови, асептично пакување, вакуум пакување, амбалажни филмови и обвивки коишто може да се јадат, активно пакување, интелигентно пакување и др.

Целта на истражувањето во овој дипломски труд е да се покаже како современите пакувања на храна со нивните позитивни и негативни карактеристики влијаат на продолжување на рокот на траење. Исто така, како може да се пресмета и да се предвиди рокот на траење на производот со примена на принципите на термодинамика земајќи ја предвид неговата природа, како и карактеристиките на амбалажниот материјал во кој е спакуван.

Рок на траење и фактори кои влијаат на негово продолжување

Рок на траење

Рокот на траење на храната е всушност временски период во кој производот се смета соодветен за консумирање. Ова значи дека производот не е расипан или со намален квалитет со што би бил неприфатлив за потрошувачот. Рокот на траење гарантира дека нема да се образуваат токсични продукти во производот, ниту дека ќе дојде до загуба на хранливите состојки под границите пропишани за нутритивна вредност на производот. Производот мора да остане безбеден за консумирање, да не предизвикува труење како резултат на присуство на патогени микроорганизми или да се создадат токсини во него во периодот на чување.

Степен на расипување

Храната е расиплива по природа. Промени може да се забележат и при процесот на чување од страна на производителот, трговците на мало или купувачот. Овие промени може да се одвиваат брзо како што е примерот со расипување на месо и риба, или пак да траат подолг период како што е примерот со мувлосување на леб. За некои производи како што се конзервирани и

многу суви производи, влошувањето на квалитетот може да не биде забележано со месеци, па дури и со години на чување на тој производ.

Влијание на преработка на производот врз преживувањето на патогените микроорганизми

Преработката на храната може да го елиминира или барем да го намали бројот на присутните микрорганризми. Ова ќе го продолжи рокот на траење на производот така што ќе го редуцира бројот на присутните штетни микрорганризми. Важно е да се земе во предвид фактот дека процесот на миене на храната со вода или термичката преработка нема да ги елиминира сите микрорганризми коишто се присутни и некои од нив може да преживеат. Ова особено важи за оние бактерии кои произведуваат спори отпорни на топлина. Тоа значи дека и најдобро преработениот производ не е стерилан и сепак ќе подлегне на расипување, но во помала мера во однос на непреработениот. Исто така, важно е да се забележи дека сите патогени присутни во непреработената храна или состојки обично се намалени до безбедно ниво во истата, доколку тие пораснат за време на чувањето, тој производ веќе станува небезбеден за консумација после одреден период. Има и бактерии коишто продуцираат спори кои се многу резистентни на термичка преработка при што нема да бидат елиминирани со процес на миене. Ова ги вклучува бактериите кои предизвикуваат расипување на храната, како и патогените. Доколку овие спори се присутни потребно е тоа да се земе во предвид при одредување на рокот на траење на производот.

Иако преработката на храна вообичаено го намалува бројот на патогени присутни во повеќето сировини и состојки, сепак одредени преработки на храната може да вклучат чекори коишто ќе го зголемат бројот на патогени во одредени производи. Ова вообичаено е случај со ферментирани производи како на што се сирење и салама. Ако сировините не биле претходно преработени за да се елиминираат патогените со пастеризација на млеко, условите коишто овозможуваат да се одржи ферментацијата воедно ќе овозможат и раст на патогените. За да се осигура безбедноста

на овие производи неопходно е да се осигури дека бројот на патогените во сировините се на најниско можно ниво и дека се присутни адекватни спречувачи кои ќе ги инхибираат и елиминираат преживеаните патогени. За да се постигне тоа се додаваат киселини, соли, нитрати и нитрити.

Сепак преработката се очекува во повеќето случаи да го намали бројот на микрорганризми и да ја зголеми безбедноста на производот, тоа сепак може да допринесе да се случи понатамошна контаминација. Ова се случува бидејќи некои патогени може да станат извор на контаминација откако преработката ќе заврши, пред и по пакување на производот. Истиот проблем може да настане и при контаминација од микрорганризми коишто предизвикуваат расипување.

Влијание на замрзнувањето врз рокот на траење и безбедноста на производот

Рокот на траење на многу производи може да биде продолжен доколку тие се чуваат во замрзнувачи. Ниските температури ги намалуваат хемиските промени и растот на многу штетни и патогени бактерии, мувли и квасци. Сепак, постојат одредени патогени бактерии коишто се способни да растат лесно при ниски температури. Во некои ситуации нивоата во коишто се присутни овие патогени во производот може да се сметаат за сигурни во почетокот од рокот на траење. Подолгиот рок на траење овозможува подолго време овие патогени да пораснат. Ова ќе има поголемо влијание на рокот на траење на производот и барањата за датумот на производство.

Хемиски промени коишто може да се случат за време на чувањето

Како што микрорганризмите може да пораснат за време на чувањето, може да се случат и други промени во составот на производот. Ова влошување на квалитетот на производот може да го направи истиот неприфатлив за потрошувачите доколку тие сметаат дека тој се расипал со што квалитетот не ги задоволува нивните очекувања. Во некои случаи промените во производот може да го направат небезбеден заради природата на компонентите формирани за време на распаѓањето. Исто така, присуството на есенцијалните

хранливи компоненти може да е пониско од очекуваното од страна на потрошувачите. Ова е особено важно доколку тој производ се косумира за да обезбеди доволно количество на одредена компонента, како на пример витамини. Тоа секако ќе има влијание и на барањата за одредување на рокот на траење.

Фактори коишто влијаат на рокот на траење

Со разбирањето на факторите коишто се особено важни за рокот на траење на производот, можно е манипулирање на овие фактори со цел да се продолжи рокот на траење на тој производ. Исто како промените во составот, така и условите при преработката и пакувањето може да доведат до намалување на рокот на траење или да го направат производот поподложен на штетни бактерии и/или патогени микроорганизми. Важно е да се земат предвид сите промени коишто се случуваат во производот или пакувањето заради тоа што тие може да влијаат на рокот на траење. Ова е особено важно бидејќи безбедноста на производот и неговиот рок на траење зависи од голем број фактори.

Загуба на храна во однос на пакувањето

Според резултатите презентирани во литературата, пакувањето на храната може да придонесе за намалувањето на количината на храна којашто се фрла заради краткиот рок на употреба. Главен приоритет на потрошувачите е да се продолжи периодот во кој храната останува свежа. Во моментот потрошувачите не располагаат со доволно информации за пакувањето или за опаковките што можат да се употребат, ниту пак се свесни за предностите од опаковките коишто можат да го продолжат рокот на траење на храната. Поради тоа, постои интерес за амбалажа којашто ќе придонесе храната да се одржува свежа, пред и после отворањето како и да се дадат јасни инструкции на самата амбалажа коишто ќе им помогнат на потрошувачите правилно да ја чуваат храната.

Многу потрошувачи не се свесни дека амбалажата ја заштитува храната и веднаш ја отстрануваат или ја оштетуваат со што го намалуваат рокот на траење на храната. Потрошувачите треба да ја препознаат

важноста од амбалажирање на храната и нивниот став кон овој процес да е помалку негативен.

Грижата околу пакувањето на храната се намалува со зголемување на информираноста на потрошувачите. Забележано е дека ставот на потрошувачите се менува кога ќе им се покажат серија од добро дефинирани изјави поврзани со пакувањето на храната. Две од изјавите кои се покажале ефективни се следните: „Амбалажирањето посвежа, не само на полиците од супермаркетите, туку и во вашите домови“ и „Голем дел (85 %) од амбалажата може да се рециклира така што негативните ефекти по животната средина се помали отколку што се чини“.

Грижата околу фрлањето на храната се зголемува со зголемување на информираноста на потрошувачите. Постои јасна разлика меѓу тенденциите на потрошувачите поврзани со интересот за амбалажирањето на храната од една страна, и грижата за фрлање на храна од друга, пред и после разгледувањето на одредени изјави поврзани со овие теми. На пример, според резултатите од истражувања (FPA, 2014) ако одговорноста на потрошувачите околу пакувањето и фрлањето на храната била 72 % на почетокот, после разгледување на серија од добро дефинирани изјави на овие теми, грижата околу фрлањето на храната се зголемила на 80 %, додека пак интересот за пакување на храната се намалил на 58 %.

Најголемо влијание е забележано кај две подгрупи на потрошувачи поврзано со возраста и ставот кон животната средина. Постарите потрошувачи имаат став дека амбалажата има негативни последици по животната средина и не се во состојба да ги видат позитивните ефекти. Оваа популација има став дека пакувањето на храната придонесува за нејзино побрзо расипување, затоа што кога е затворена се зголемува влажноста внатре во амбалажата и се намалува рокот на траење на храната. Помладите потрошувачи од друга страна се амбивалентни и побрзо ги препознаваат позитивните ефекти од пакувањето и особено им е важно што пакуваните производи остануваат подолго време свежи.

Потрошувачите коишто повеќе се грижат за животната средина имаат тенденција да

размислуваат дека пакувањето може да се претвори во голем проблем за животната средина. Во секој случај тие исто така се подложни на позитивни пораки поврзани со пакувањето и многу често го признаваат напредокот што во тој поглед е направен од производителите и дистрибутерите на храна. Тие исто така, се свесни дека отпадната храна може да претставува проблем за животната средина.

Една од финалните препораки сугерира дека организациите поврзани со производство и пакување на храна, како што се производителите на храна и амбалажа, дистрибутерите и трговските здруженија би требало да се ангажираат што повеќе да ги информираат потрошувачите за иновациите што се направени од нивна страна, а се поврзани со пакувањето и означувањето на храната, да ја зголемат нивната свесност за можните предности и да ги охрабрат за да консумираат пакувана храна и правилно користење на амбалажата, како и да преземат понатамошни чекори за нови иновации.

Определување на рокот на траење на пакувањата за храна и производи

Врз рокот на траење на прехранбените производи големо влијание има изборот на амбалажата. Ова влијание може да се определи со помош на информации за разградбата на производот и видот на заштита обезбеден со пакувањето. Постои научна основа за оценување на рокот на траење со помош на математички изрази коишто се корисни во предвидување на разградувањето на прехранбените производи за време на чувањето. Таа се базира на принципите на хемиската кинетика (Denis R. Heldman, 2009). Всушност, се испитуваат промените во квалитетот (Q) кои се следат и се мерат со текот на времето. Општиот израз за квалитетот може да се претстави со следнава равенка:

$$\pm \frac{d[Q]}{dt} = k[Q]^n \quad (1)$$

Кадешто знакот $\pm$ покажува дека квалитетот може да се зголеми или намали за време на чување, k е константа на псевдодвижење, n е ред на реакција.

Пример, ако квалитетот се намалува со тек на времето равенката може да се напише на следниов начин:

$$-\frac{d[Q]}{dt} = k[Q]^n \quad (2)$$

Хемиската кинетика е област од хемијата што се занимава со брзината на хемиските реакции. Зборот „кинетика“ се однесува на движење или промена. Кинетичката енергија се дефинира како енергија што произлегува од движењето на еден објект. Во овој случај зборот кинетика се однесува на брзината на реакцијата која претставува промена на концентрацијата на даден реактант или продукт со текот на времето ($\text{mol/L} \cdot \text{s}^{-1}$). Познато е дека било која реакција се одвива во насока од реактанти кон продукти. Во текот на реакцијата концентрацијата на реактантите се намалува, додека концентрацијата на продуктите се зголемува. Како резултат на тоа, напредувањето на реакцијата може да се следи преку намалувањето на концентрацијата на реактантите. Така, брзината на реакцијата може да се изрази на следниов начин:

$$\text{брзина на реакција} = -\frac{\Delta[A]}{\Delta t}$$

$$\text{брзина на реакција} = \frac{\Delta[B]}{\Delta t}$$

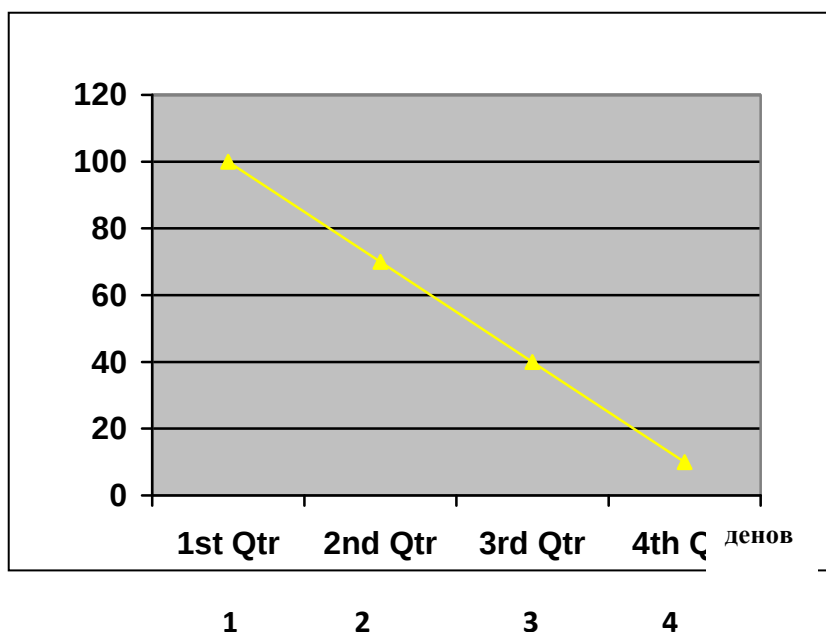
Каде што $\Delta[A]$ и $\Delta[B]$ се промените на концентрацијата на реактантот A и продуктот B во временски период Δt . Бидејќи концентрацијата на реактантот A со текот на времето се намалува, $\Delta[A]$ има негативен предзнак. Брзината на хемиската реакција е позитивна величина па за да добие позитивна вредност во изразот за брзина на хемиска реакција мора да се стави знакот минус. Од другата страна, во случај кога брзината се изразува со помош на концентрацијата на продукти не е потребен знакот минус, бидејќи $\Delta[B]$ има позитивен предзнак. Овие брзини се просечни брзини бидејќи се просек за

определен временски период Δt . Следниот чекор е да се види како се определува брзината на реакцијата експериментално. По дефиниција, познато е дека за да се определи брзината на реакцијата потребно е да се следи промената на концентрацијата на реактантите како функција од времето. За реакциите во раствор, честопати, концентрацијата на одделни компоненти може да се измери спектроскопски. Доколку се присутни јони концентрацијата може да се определи и со мерење на електричната спроводливост.

На слика 1 е прикажана крива на измерениот однос на квалитетот којшто останува по различно време на складирање. Кривата е линеарна, што укажува на тоа дека брзината на загуба на квалитетот останува константна во текот на времето.

Реакција од нулти ред

Q



Слика 1. Линеарно намалување на квалитетот со текот на времето

Со оваа линеарната зависност е прикажана реакција од нулти ред. Затоа, со замена $n = 0$ во равенка (2) се добива:

$$-\frac{dQ}{dt} = k \quad (3)$$

Оваа равенка може да се реши со поделба на променливите за да се добие алгебарско решение. Почетниот квалитет е претставен со Q_i додека квалитетот по некое време (t) на чување на производот се означува со Q .

$$\int_{Q_i}^Q d[Q] = k \int_0^t dt \quad (4)$$

Со интегрирање на равенката (4) се добива:

$$[Q_i] - [Q] = k \cdot t \quad (5)$$

Во равенката (5) левата страна го означува досегот на реакција (ξ) којшто следи кинетика од нулти ред. Со негова замена се добива равенката (6).

$$\xi = kt \quad (6)$$

Рокот на траење на прехранбениот производ врз основа на промените на квалитетот во однос на времето кога овие промени ја следат кинетика од нулти ред може да се прикаже со равенката (7).

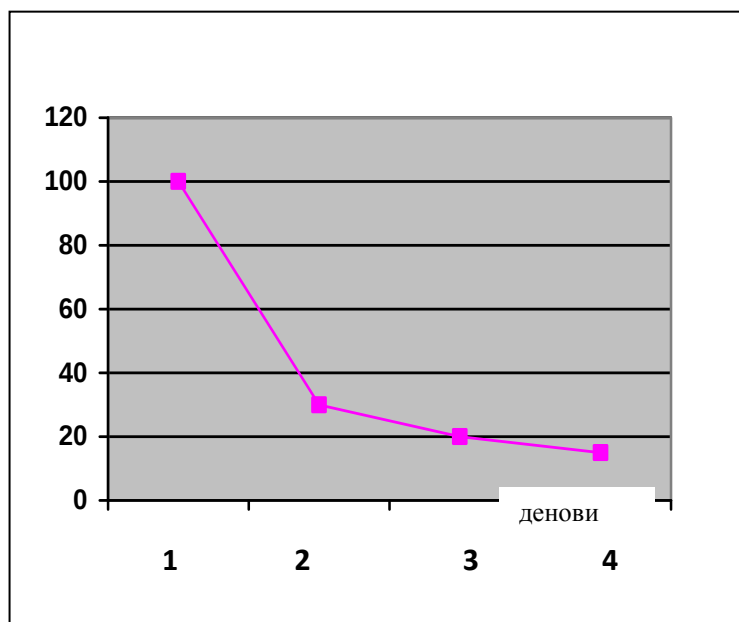
$$t_s = \frac{[Q_i] - [Q_f]}{k} \quad (7)$$

кадешто, t_s е времето коешто го прикажува рокот на траење на прехранбениот производ, Q_i е износот на квалитетот на почетокот од рокот на траење, Q_f е износот на квалитетот на крајот од рокот на траење.

Реакција од прв ред

Брзината на губење на квалитетот на производот зависи и од останатите својства како што се губењето на витамини, протеини и микробиолошкиот раст. Во овој случај брзината на разградување на храната со текот на времето покажува експоненцијално намалување (слика 2).

Q



Слика 2. Експоненцијално намалување на квалитетот на производот со текот на времето

Експоненцијалното намалување на квалитетот е опишано со кинетика од прв ред, каде што во равенката за брзина на реакцијата се заменува $n = 1$, при што равенката (2) може да ја запишеме на следниов начин:

$$-\frac{d[Q]}{dt} = k[Q] \quad (8)$$

Со интегрирање на равенката (8) се добива следнава равенка:

$$-\frac{d[Q]}{[Q]} = k \cdot dt \quad (9)$$

Повторно, претпоставуваме дека почетниот квалитет е $[Q_i]$ и по време t се намалува на $[Q]$, како што е дадено во равенката (10).

$$-\int_{Q_i}^Q \frac{d[Q]}{[Q]} = k \int_0^t dt \quad (10)$$

Со интегрирање на равенката (10) се добива равенката (11):

$$\ln[Q_i] - \ln[Q] = kt \quad (11)$$

За реакцијата од прв ред досега до сега на реакција се пресметува со помош на изразот (12):

$$\xi = \ln[Q_i] - \ln[Q] \quad (12)$$

Со комбинирање на равенките (11) и (12) се добива равенката (13):

$$\ln \frac{[Q]}{[Q_i]} = -kt \quad (13)$$

За да се пресметаат промените во квалитетот по определен период на чување равенката (13) може да се запише на следниов начин:

$$\frac{[Q]}{[Q_i]} = e^{-k \cdot t} \quad (14)$$

Ако $[Q_f]$ го претставува квалитетот на крајот од рокот на траење, тогаш равенката ќе го добие следниов облик:

$$t_s = \frac{\ln \frac{[Q_i]}{[Q_f]}}{k} \quad (15)$$

Равенката може лесно да биде модифицирана ако сакаме да го пресметаме полувремето на распаѓање на квалитетот. Со замена на $[Q_f] = 0,5 Q$ се добива:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (16)$$

Влијанието на условите на средината во текот на чувањето на производот се изразува преку големината на константата на брзина k .

Влијанието на температурата на константата на брзината се изразува преку Арениусовата равенка (17):

$$k = B \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T_A}} \quad (17)$$

каде што енергијата на активација (E_A) го квантифицира влијанието на температурата на брзината на разградување на квалитетот на производот за време на чувањето.

Заклучок

Подобрата безбедност, погодност, рокот на траење и севкупниот квалитет на производите се должи на последните иновации во пакувањето на храна и прехранбени производи. Новите пакувања обезбедуваат можности за откривање на промените во производот на време на складирање и дистрибуција. Идниот развој ќе обезбеди посовистицирано пакување за да се продолжи рокот на траење и за да се подобри квалитетот на прехранбениот производ.

Пакувањето на храната во повеќеслојни амбалажи претставува одлична алтернатива за воспоставување на бариера кон гасови, мириси и влага.

Замената на воздухот во пакувањето до смеса од фиксни гасови доведува до контрола на атмосферата во рамки на

пакувањето, а тоа секако влијае врз рокот на траење на прехранбениот производ.

Вакуумот функционира на сличен начин како модифицирана атмосфера со таа разлика што кај вакуумот се извлекуваат гасовите со цел да се намали оксидацијата и да се задржи формата на продуктот.

Со употреба на амбалажни филмови и обвивки коишто може да се јадатне само што се намалува интеракцијата на производот со надворешната средина, туку се намалува и амбалажниот отпад.

Со инкорпорирање на компоненти во системот за пакување коишто апсорбираат или ослободуваат супстанции се продолжува рокот на траење на производот. Таквите супстанции може да апсорбираат влага, етилен, јаглерод диоксид, кислород и друго. Затоа и активното пакување може да се смета како одлична алтернатива за продолжување на рокот на траење.

Рокот на траење на прехранбените производи може математички да се искалкулира, а тоа секако се одвива по законите на термодинамиката и хемиската кинетика. Со помош на ваквиот тип на калкулација може да се предвидат фазите на намалување, како на квалитетот, така и на исправноста на производот.

Литература

1. Singh, P. R., Heldman, D. R, (2009). *Food engineering*. 758-767.
2. Robertson., Gordon L, (2012). *Food Packaging: Principles and Practice*, 431
3. Mangaraj, S., T. K., Goswami., P. V. Mahajan, (2009). Applications of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables: a review. *Food Engineering Reviews*, 1,2, 133-158.
4. Realini, Carolina E., Begonya Marcos, (2014). "Active and Intelligent Packaging Systems for a Modern Society." *Meatscience*
5. Pereira de Abreu, D. A., J. M. Cruz, and P. Paseiro Losada. (2012). "Active and intelligent packaging for the food industry." *FoodReviews International*, 146-187.
6. The Value of Flexible Packaging in Extending Shelf Life and Reducing Food Waste, A Flexible Packaging Association Report, Prepared for FPA by McEwen Associates (2014).
7. Narasimha Rao, D., and N. M. Sachindra, (2002). "Modified atmosphere and vacuum

- packaging of meat and poultry products." *Food Reviews International* 263-293.
8. Nath, A., et al. (2012). "Extension of shelf life of pear fruits using different packaging materials." *Journal of food science and technology*, 556-563.
 9. Nerín, Cristina, et al, (2006). "Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 7840-7846.
 10. Patsias, A., et al, (2006). "Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes." *Food microbiology*, 423-429.
 11. Pereira de Abreu, D. A., J. M. Cruz., P. Paseiro Losada. (2012). "Active and intelligent packaging for the food industry." *Food Reviews International*, 146-187.
 12. Petersen, Jens Højslev, et al. (2004). "Evaluation of retail fresh meat packagings covered with stretch films of plasticized PVC and non-PVC alternatives." *Packaging Technology and Science*, 53-66.
 13. Realini, Carolina E., and Begonya Marcos, (2014). "Active and Intelligent Packaging Systems for a Modern Society." *Meat science*
 14. Sawaya, W. N., et al. (1993). "Shelf-life of vacuum-packaged eviscerated broiler carcasses under simulated market storage conditions." *Journal of food safety*, 305-321.
 15. Seideman, S. C., and P. R. Durland, (1983). "Vacuum packaging of fresh beef: A review." *Journal of Food Quality*, 29-47.

МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА АСПАРТАМ ВО ХРАНА

Биљана Петановска – Илиевска, Горан Јанев, Ленче Велкоска-Марковска, Мирјана С. Јанкуловска*

Универзитет Св Кирил и Методиј, Факултет за земјоделски науки и храна,
1000 Скопје, Р. Македонија;
email bpetan88@yahoo.com

Апстракт

Аспартам ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) или метил L- α – аспартил - L - фенилаланинат (IUPAC) е нискокалоричен вештачки засладувач којшто се употребува при производство на храна и пијалаци и некои витамински додатоци без шеќер.

Идеален е како средство за засладување поради малите концентрации коишто се користат за да се постигне посакуваниот ефект, но за жал многубројни се неговите негативни ефекти врз човековото здравје.

И покрај големиот број на студии што укажуваат на штетноста на аспартамот по здравјето на човекот, тој продолжува да се користи. Токму затоа, за заштита на здравјето на потрошувачите од особена важност е контролата на количеството на аспартам во прехранбените производи.

Клучни зборови: аспартам, методи, храна

METHODS FOR DETERMINATION OF ASPARTAME IN FOOD

Biljana Petanovska-Ilievska, Goran Janev, Lence Velkoska - Markovska, Mirjana S. Jankulovska*

Email: bpetanovska@fznh.ukim.edu.mk; bpetan88@yahoo.com

“Ss. Cyril and Methodius” University, Faculty of Agricultural Sciences and food, 1000 Skopje,
Republic of Macedonia

email bpetan88@yahoo.com

Abstract

Aspartame ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) with IUPAC name methyl L- α - aspartyl - L - phenylalaninate is a low-calorie artificial sweetener that is used in food production, beverages and some vitamin supplements without sugar. Aspartame is ideal as a non-sugar sweetener, used in small concentrations in order to achieve the desired effect, but unfortunately there are lots of adverse effects on the human health. Despite the large number of studies that indicate the hazard of aspartame for the human health, it's still used. For these reasons, it is particularly important to control the amount of aspartame in food products in order to achieve consumers health protection.

Key words: aspartame, methods, food

Вовед

Аспартамот е синтетички засладувач, којшто се користи од 1980 година во производството на повеќе од 6000 продукти, вклучувајќи и околу 500 лекови (Soffritti M., и сор.). Поради неговиот висок степен на сладост се користи како замена за сахарозата и останатите шеќери.

Аспартам ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) или метил L- α – аспартил - L - фенилаланинат (IUPAC) е нискокалоричен вештачки засладувач којшто се употребува при производство на

храна и пијалаци, особено безалкохолни пијалаци, мастики за цваќање без шеќер, бомбони и некои витамински додатоци без шеќер. Аспартамот претставува бел прав со сладок вкус, без мирис. Приближно 200 пати е поблаг од сахарозата. Во кисела средина хидролизира до метанол, а при несоодветни услови на чување неговата пептидна врска хидролизира и се добиваат слободни аминокиселини (Ager D. J., и сор.).

Метаболити на аспартам се метанол, фенилаланин и аспарагинската киселина (Сл.1.) (Nantachit K, и сор.), а неговите деградациски производи се 5-бензил-3,6-диоксо-2-пиперазин оцетна киселина (DKP) и β -аспартам, кој исто така може да бидат присутни во засладувачот како нечистотии. Фенилаланин (Phe) е есенцијална аминокиселина која влегува во градбата на протеините, таа не се синтетизира во телото и мора да се внесе преку исхраната. Во организмот може да се конвертира во тирозин, што е уште една протеинска аминокиселина.

Фенилкетонурија (PKU) е наследна болест која предизвикува висока концентрација на фенилаланин и ниско количество на тирозин во крвта. Висока концентрација на фенилаланин во крвта е токсична за мозокот и може, ако не се лекува, да влијае на развојот на мозокот и да предизвика ментална ретардација, нарушувања на расположението и проблеми во однесувањето. Повеќето третмани на PKU имаат цел да го задржат количеството на фенилаланин во крвта на прифатливо ниво, што се постигнува со редуцирана употреба на храна богата со белковини (месо, риба, јајца, млечни производи, ореви и семки), храна со многу скроб, вклучувајќи и храна што содржи брашно (леб, тестенини), како и храна и пијалаци кои содржат аспартам. Во Европската унија, сите производи што содржат аспартам мора да бидат етикетирани како „Содржи извор на фенилаланин“ со цел да се заштитат потрошувачите, кои треба да го избегнат изложувањето на оваа аминокиселина.

Европската агенција за безбедност на храна (EFSA- European Food Safety Authority) на 15 февруар 2013 година закажа јавна расправа со сите засегнати и заинтересирани страни во врска со предлог мислењето за безбедност на аспартам како вештачки засладувач.

Ре-евалуацијата на аспартам е дел од системските ре-евалуации на сите прехранбени адитиви одобрени во ЕУ пред 20 јануари 2009 година. Во мај 2011 година, Европската комисија од EFSA побара предвреме да направи целосна ре-евалуација на безбедноста на аспартамот (E 951), која беше планирано да заврши до 2020 година. Во 2013 година EFSA донесе одлука дека аспартам е безбеден за

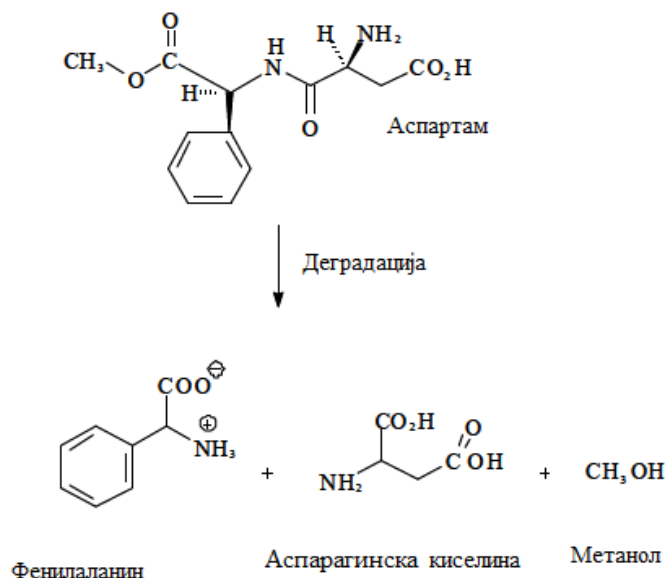
консумација во количество определено со прифатливиот дневен внес (40 mg/kg телесна маса, European Food Safety Authority).

Според доктор Ralph Golan M.D, при постојана употреба и внесување на поголемо количество на аспартам со текот на времето, заради присуството на метил алкохол можно е да дојде до појава на главоболка, губење на свест, панични напади, губење на меморија, промени во расположението, депресија, гастроинтестинални проблеми итн. Мали количества од овој засладувач може да бидат безбедни, меѓутоа може да се јават кумулативни ефекти предизвикани заради синергија во случај кога се консумира храна што има висока содржина на јаглехидрати и ниска содржина на протеини како што се енергетските пјалаци. По консумирање на храна и пијалаци коишто содржат аспартам може да се јават и следниве симптоми: зависност, гадење, халуцинации, грчеви, абнормални дишења, депресија, потешкотии при воспоставување контрола на дијабетисот со инсулин или останати лекови, влошување на дијабетисот како што е ретинопатија, катаракта, невропатија и гастропареза (Wurtman R. J, 1983, 1985, 1986).

Фенилаланинот и аспарагинската киселина може да се најдат во разновидна храна како составен дел на протеините. Аминокиселините од аспартамот се апсорбираат и метаболизираат различно од аминокиселините кои се застапени природно во храната. Протеините и аминокиселините коишто се наоѓаат природно во храната се разложуваат постепено и целосно, а потоа постепено се апсорбираат во организмот. Ова потполно разложување води до мало апсорбирање и мало зголемување на некои аминокиселини. Во случајот со аспартамот, аспарагинската киселина и фенилаланинот (кои се слободни аминокиселини а не протеински) многу брзо се апсорбираат што предизвикува зголемување на овие аминокиселини во организмот. Во однос на метанолот, постојат тврдења дека некои овошни сокови и алкохолни пијалаци содржат мали количества од оваа супстанца (Bagua J., и Bal A. 1995). Од голема важност е да се забележи дека метанолот никогаш не се појавува сам кај овие производи туку

секогаш заедно со него е присутен и етанолот, којшто главно се наоѓа во повисоки концентрации од метанолот. Етанолот претставува антидот на метанолот за луѓето (Woodrow C. M., 1984). Во

аспартамот етанолот не е присутен. Речиси сите компоненти и метаболички продукти на аспартамот се со сомнителна токсичност Wurtman R. (1985, 1986, 1988).



Слика 1. Деградициски продукти на аспартам

Fig.1. Aspartame degradation products

Оттука заради важноста на неговата контрола во прехранбените производи, произлегува и целта на овој труд: да се образложи влијанието на аспартамот врз здравјето на човекот и да се прикажат

некои аналитички методи за квалитативно и квантитативно определување на аспартам во храната и пијалациите, заради заштита на здравјето на потрошувачите.

Материјал и методи

Во литературата се сретнуваат податоци за определување на аспартам во различни прехранбени производи како што се: Така на пример, авторите Khesorn Nantachit, Somporn Putiyanan и Prapart Phoowiang (2008) извршиле

За идентификација на аспартам ги користеле следниве раствори:

Раствор од нинхидрин: подготвен со растворање на нинхидрин во 50 mL етанол и 10 mL глацијална оцетна киселина.

Раствор од алкален хидроксиламин: Овој раствор може да се подготви на два начина и тоа со растворање на 12,5 g

хидроксиламин хидрохлорид во метанол до волумен од 100 mL (1) и со растворање на 12,5 g натриум хидроксид во метанол.

Потоа се разредува до 100 mL со истиот

растворувач (2).

газирани пијалаци, енергетски пијалаци, изотонични пијалаци, засладувачки адитиви, диетални додатоци и др.

идентификација и квантитативно определување на аспартам во 4 различни примероци храна.

Раствор од железо(III) хлорид: Се зема 10,5 g железо(III) хлорид и се раствора со 95 % етанол до волумен од 100 mL.

Методи за идентификација на аспартам: За идентификација на аспартам авторите ги користеле следниве методи:

Метод со раствор од нинхидрин: Идентификацијата на аспартам е извршена со примена на тенкослојна хроматографија (TLC Thin Layer Chromatography). За таа цел, примероците се раствораат во вода и се нанесуваат на хроматографската плоча. Хроматографската плоча се потопува во

мобилна фаза составена од ацетонитрил и фосфатен пуфер (10/90, V/V). Фосфатниот пуфер е подготвен од калиум дихидрогенфосфат, со концентрација 6,8 g/L подесен до pH=3,7 со помош на фосфорна киселина. После развивањето на хроматограмот, хроматографската плоча се суши, се прска со раствор од нинхидрин и се загрева со топол воздух во печка.

Метод со раствор од алкален хидроксиламин: Хроматографската плоча на којашто е нанесен примерокот што содржи аспартам е развиена на ист начин како со нинхидринскиот метод, со таа разлика што наместо со раствор од нинхидрид, хартијата се прска со алкален хидроксиламин и се суши. Потоа се прска со раствор на хлороводородна киселина (1:1) и повторно се суши. На крај се прска со раствор на железо (III) хлорид и повторно се суши.

Колориметриски метод: За подготовка на примерокот за анализа со колориметрискиот метод се зема 1 g од примерокот и се раствора во 40 mL дестилирана вода, а потоа се разрежува до волумен од 100 mL со апсолутен етанол. Се зема 1 mL ацетатен пуфер и се меша со 1 mL од растворот од примерокот и 2 mL раствор од нинхидрин. Оваа смеса се загрева во водена бања 8 минути а потоа смесата се раствора со 10 mL апсолутен етанол.

HPLC метод: За HPLC анализата е користен течен хроматограф HPLC (Agilent 1100), опремен со детектор со низа од диоди (DAD, diode array detector). Како стационарна фаза е употребена аналитичка колона од типот Waters Spherisorb ODS 2 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Смесата од ацетонитрил и фосфатен пуфер е користена како мобилна фаза со проток од 1 mL/min.

Резултати и дискусија

Резултати од тестот со нинхидрин:

Аспартамот реагира со нинхидринот при што се добива соединение со виолетова боја. Реакцијата се одвива со загревање, а равенката на оваа реакција е прикажана на Сл.2.

После извршениот тест со нинхидрин, на хроматографската плоча се забележува виолетово обојување, што е доказ за присуство на аспартам.

Испитувањето покажало дека долната граница на детекција на овој метод изнесува 7,5 μ g (Nantachit K. и сор., 2008).

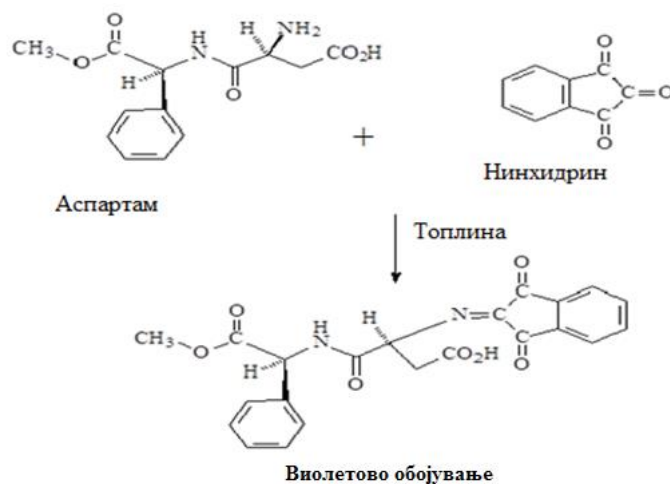
Овој метод е чувствителен до 7,5 μ g, но не е специфичен за аспартамот затоа што со овој метод може да се детектираат аминокиселини кои имаат слободна α -амино група.

Резултати од тестот со алкален хидроксиламин:

Равенката на хемиската реакција на аспартамот со хидроксиламинот е прикажана на Слика 3. Како краен продукт при оваа реакција се добива комплексно соединение на железо со кафена боја. Затоа при изведување на овој тест, присуството на аспартам е означено со кафено обојување на хроматографската плоча.

Лимитот на детекција на аспартамот на овој метод изнесува 300 μ g (Nantachit K. и сор., 2008). Во споредба со тестот со нинхидрин може да се заклучи дека овој метод е помалку осетлив.

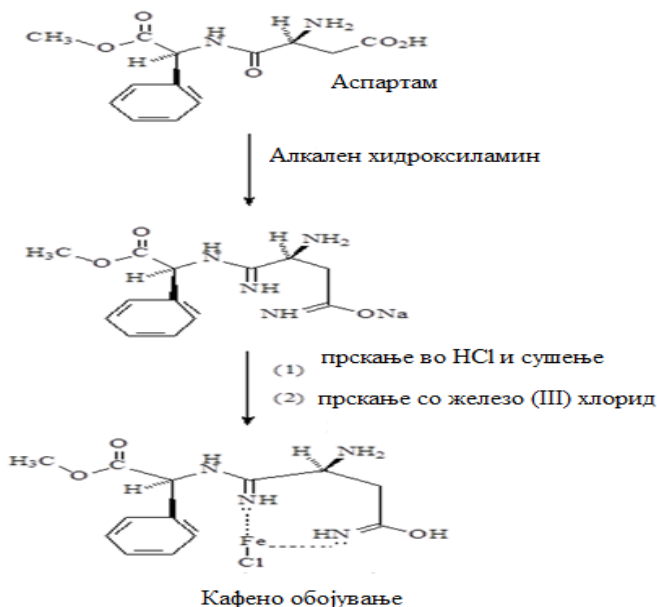
Методот со примена на раствор од алкален хидроксиламин не е чувствителен, но е специфичен за аспартамот и се користи за детекција на карбонилни групи што формираат обоен комплекс со раствор од железо(III)хлорид.



Слика 2. Равенка на хемиска реакција на нинхидрин со аспартам
Fig.2. Equation of chemical reaction between ninhidrine and aspartame

Резултати од анализата со колориметрискиот метод: Аспартамот во видливиот дел на спектарот покажува максимална апсорпција на 406 nm и 557 nm. Апсорпцијата на 406 nm е стабилна и затоа мерењето е изведено на оваа бранова должина. Виолетовата боја на растворот од примерокот е стабилна најмалку 1,5 часа. Испитувањата покажале дека методот е линеарен во концентрациско подрачје од 7,5 до 37,5 $\mu\text{g/mL}$. Колориметрискиот

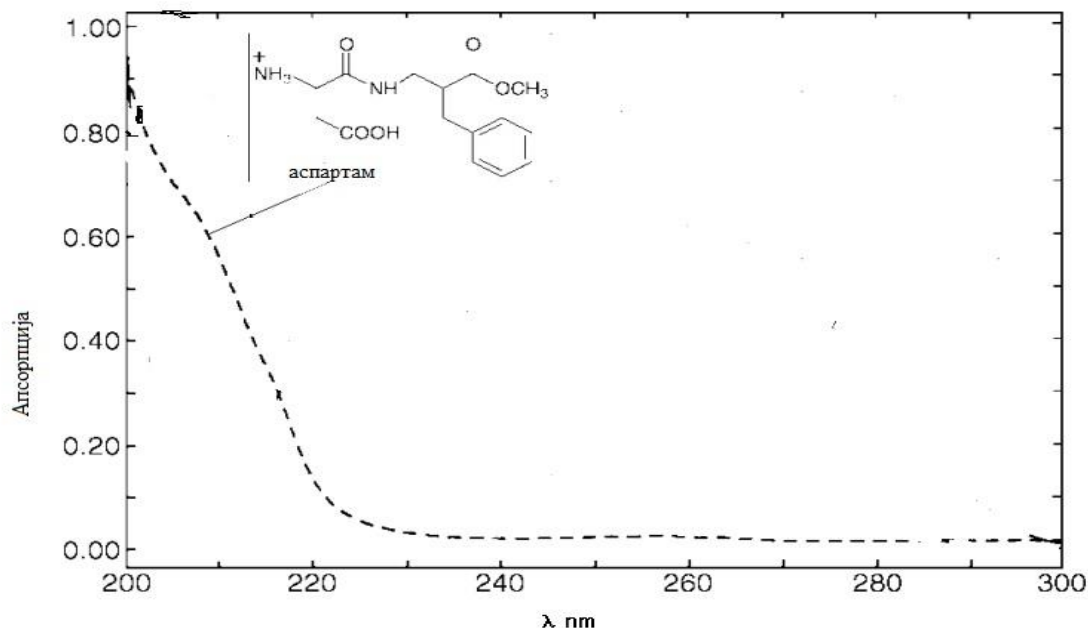
метод се карактеризира со мала прецизност, бидејќи аспартамот е хирално соединение кое е нестабилно и се распаѓа под дејство на топлина. Пресметаните вредности за релативната стандардна девијација (RSD) изнесуваат од 5-6 %. Овој метод се одликува со задоволителна точност, што се потврдува преку вредностите за аналитичкиот принос, којшто изнесува околу 97 %.



Слика 3. Равенка на хемиска реакција на алкален хидроксиламин со аспартам
Fig.3. Equation of chemical reaction between alkaline hydroxylamine and aspartame

Резултати од HPLC анализата: Имајќи го предвид UV спектарот на аспартам (Сл. 4)

јасно е зошто хроматографскиот процес е следен на бранова должина од 214 nm.

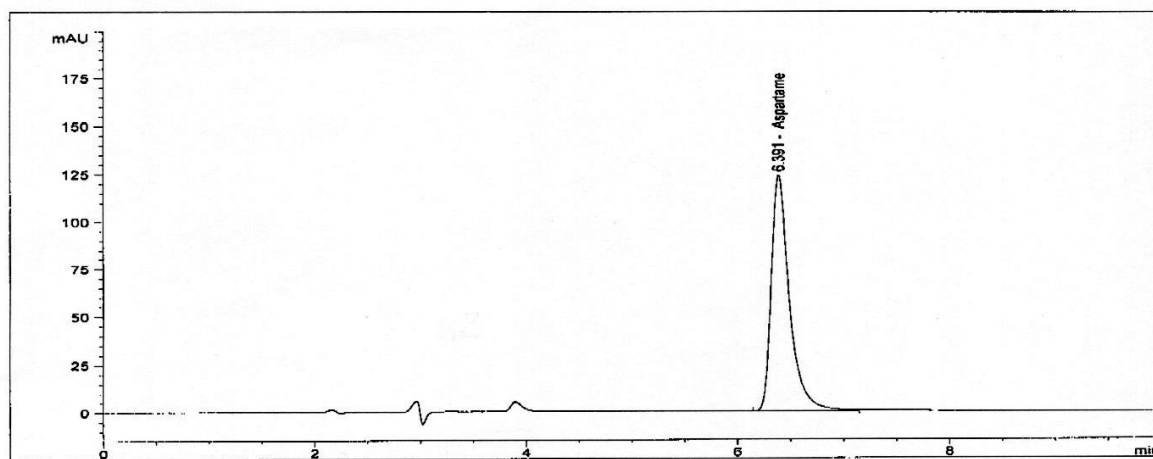


Слика 4. UV спектар на аспартам

Fig.4. UV spectra of aspartame

Како резултат на тоа што аспартамот на топло се деградира, HPLC методот може да даде помалку прецизни резултати доколку примероците не се чуваат соодветно. Пресметаните вредности за RSD се движат

од 3 до 11 %. Вредностите за аналитичкиот принос на овој метод не се разликуваат од оние добиени со колориметрискиот метод (~97 %).



Слика 5. Хроматограм од аспартам во анализиран примерок добиен со HPLC методот

Fig.5. Chromatogram of aspartame in sample matrix obtained by HPLC method

При анализирање на примероците со двете методи е утврдено дека аспартамот е определен во помали количества од декларираниите. Ова се должи на тоа што најверојатно примероците се чуваат

несоодветно, при што аспартамот се деградирал (Nantachit K. и sor., 2008).

На Слика 5. е даден хроматограм од аналитичкиот стандард на аспартам добиен од HPLC анализата. Како што може да се види од хроматограмот, потребното време

за елуирање на аспартамот при опишаните услови на работа е околу 6,4 min.

Заклучок

Аспартамот е адитив којшто се користи при производство на различни производи наменети за исхрана на човекот. Идеален е како средство за засладување поради малите концентрации коишто се користат за да се постигне посакуваниот ефект, меѓутоа, многубројни се неговите негативни ефекти врз човековото здравје.

И покрај големиот број на студии што укажуваат на штетноста на аспартамот по здравјето на човекот, тој продолжува да се користи. Од овие причини, од особена важност е контролата на количеството на аспартам во прехранбените производи заради заштита на здравјето на потрошувачите.

Литература

1. Soffritti M., Padovani M., Tibaldi E., Falcioni L., Manservigi F. and Belpoggi F., (2014) The Carcinogenic Effects of Aspartame: The Urgent Need for Regulatory Re-Evaluation, AMERICAN JOURNAL OF INDUSTRIAL MEDICINE, 1-15.
2. Ager D. J., Pantaleone D. P., Henderson S. A., Katritzky A. R., Prakash I., Walters D. E. (1998). Commercial, Synthetic Non-nutritive Sweeteners. Angewandte Chemie International Edition 37 (13-24), 1802-1817.
3. European Food Safety Authority (EFSA) Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive, (2013), EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), , Parma, Italy, 1-263.
4. Nantachit K., Putiyanan S., Phoowiang P. (2008). Identification and determination methods of aspartame. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 3(2), 214-218.
5. Wurtman R. J. (1983). Neurochemical Changes Following High-Dose Aspartame with Dietary Carbohydrates. New England Journal of Medicine, 389, 429-430
6. Wurtman R. (1985). Aspartase: Possible effect on seizure susceptibility. Lancet 2, 1060.
7. Wurtman R. J., Walker E. R. (1988). Dietary Phenylalanine and brain function. Birkhauser, Boston.
8. Walton R. (1986). Seizure and mania after high intake of aspartase. Psychosomat 27, 218-219.
9. Roberts H. J. (1988). Reactions attributed to aspartame containing products. Journal of Applied Nutrition 40, 85-94.
10. Barua J., Bal A. (1995). Emerging facts about aspartame. Journal of the diabetic association of India, vol.35, No.4.
11. Woodrow C. M. (1984). Aspartame: Methanol and the public health. Journal of applied nutrition, 36 (1), 42-53.



Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences

"Ss. Cyril and Methodius" University in Skopje
Faculty of Agricultural sciences and food-Skopje
P.O. Box 297, MK-1000 Skopje,
Republic of Macedonia
jafes@fzh.ukim.edu.mk
www.fzh.ukim.edu.mk/jafes/