

TDK dolgozat

2022

Hegyí Olivér
Széchenyi István Egyetem
Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar

**Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszer fejlesztése
cukormentes italokban lévő édesítőszerék, tartósítószerék és koffein
egyidejű elemzéséhez**

Konzulens:
Dr. Sik Beatrix
Egyetemi tanársegéd

**Mosonmagyaróvár
2022**

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzés.....	4
2	Irodalmi áttekintés	5
2.1	Alkoholmentes italok.....	5
2.1.1	Szénsavas üdítőital fogalma.....	5
2.1.2	Gyümölcsnektár fogalma	5
2.1.3	Jeges tea fogalma	5
2.1.4	Energiaital fogalma	5
2.1.5	Fogyasztási szokások.....	6
2.2	Élelmiszer-technológiai adalékanyagok	6
2.2.1	Édesítőszeresek	6
2.2.1.1	Természetes édesítőszeresek	7
2.2.1.2	Mesterséges édesítőszeresek.....	8
2.2.2	Tartósítószeresek	10
2.2.2.1	Nátrium-benzoát jellemzése	11
2.2.2.2	Kálium-szorbát jellemzése	11
2.3	Koffein.....	12
3	Anyagok és módszerek.....	14
3.1	Felhasznált vegyszerek.....	14
3.2	Alkalmazott analitikai berendezések.....	14
3.3	Kromatográfiás körülmények	14
3.4	Minták és minta-előkészítés.....	15
3.5	Rendszeralkalmassági teszt	15
3.6	Analitikai módszer validálása	15
4	Eredmények és értékelésük	17
4.1	Kromatográfiás elválasztás optimalizálása	17
4.2	Rendszeralkalmassági teszt	18
4.3	HPLC módszer validálása	19
4.4	A minták elemzése	20
5	Összefoglalás	25
6	Irodalomjegyzék	26
7	Rövidítésjegyzék	30

1 Bevezetés és célkitűzés

Az elmúlt években az alkoholmentes italok fogyasztása hazánkban folyamatosan növekszik; 2006-ban az egy főre jutó fogyasztás elérte az évi 195 litert. Az alkoholmentes italok csoportjába tartoznak az ásványvizek a szénsavas üdítőitalok és a gyümölcsle termékek. A fogyasztói igények változására egyre nagyobb mennyiségben találkozhatunk a piacon csökkentett cukor tartalmú, vagy kizárólag mesterséges édesítőszert tartalmazó, alacsonyabb energiatartalmú alkoholmentes italokkal. Világviszonylatban ezen termékekkel kapcsolatban elterjedt, hogy segítik megelőző az elhízást, ezáltal a fogyasztók is nagyobb érdeklődést mutatnak a „kalóriamentes”, „light” és a különböző gyümölcsökkel ízesített, cukormentes ásványvizek iránt. (Kiss, 2007). A diétás üdítőitalok többnyire vizet, szén-dioxidot, édesítőszereket, savanyúságot szabályozó anyagokat, aromákat, tartósítószereket és antioxidánsokat tartalmaznak (Kreigel, 2015). Ezen kívül a kóla és az energiaiitalok nagyobb mennyiségben tartalmaznak stimuláns összetevőket, általában koffeint, ezáltal elősegítve a fogyasztót, hogy kevésbé érezze magát fáradtnak (Temple et al., 2019). A legtöbb cukormentes italt mesterséges édesítőszerekkel (pl. aceszulfám-K, aszpartám, szacharin stb.) édesítik. Ugyanakkor mióta az EU-ban engedélyezték a szteviol-glikozidok használatát, egyre több gyártó használja termékeiben, mint természetes édesítőszer. A tartósítószer közül a nátrium-benzoát és a kálium-szorbát a legjelentősebbek. Bár ezek az élelmiszer-adalékanyagok általánosan biztonságos (GRAS) anyagoknak számítanak (Pressman et al., 2017), mesterséges változataik biztonságossága mindmáig vitatott, különösen nagyobb mennyiség használatakor. Kémiai szempontból továbbá a cukormentes üdítőitalok vizsgálata napirenden lévő probléma azon oknál fogva, hogy habár egyszerű mátrixnak tűnnek, összetevőik összetettsége miatt jelentős kihívásokat jelenthetnek a meghatározásukhoz használt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elemzések során (Sezgin et al., 2021). Ezen oknál fogva kutatásom célja egy rutinmérésre szolgáló laboratóriumi eljárásnak a kidolgozása és alkalmazhatóságának igazolása volt üdítőitalokban lévő koffein, különféle édesítőszerek, valamint tartósítószer egyidejű meghatározására. Vizsgálataim során összesen 69 cukormentes italt (üdítőitalok, gyümölcsnektárok, jeges teák, energiaiitalok) elemeztem. A mintákat több magyarországi szupermarketből és hazánk egyik legnagyobb gyorséttermi láncából szereztem be. Vizsgálataimhoz a HPLC készüléket diódasoros detektorral (DAD) kombináltam, ugyanis ezen készüléknek amellet, hogy számos előnyük van, (pl. teljes spektrum felvétel, csúcsok tisztaságának ellenőrzése) a legtöbb laboratóriumban rendelkezésre állnak.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Alkoholmentes italok

Az alkoholmentes italok az egyik leggyakrabban fogyasztott termékek közé tartoznak. A termékkategória szénsavas üdítőitalokra, szénsavmentes italokra, gyümölcslevekre és palackozott vizekre alcsoportosítható (Tireki et al., 2021).

2.1.1 Szénsavas üdítőital fogalma

A szénsavas üdítőitalok olyan vízalapú, ízesített, édesített, alkoholmentes italok, amelyek 12%-nál kevesebb gyümölcslevet, növényi kivonatot, vagy ezek keverékét, vagy amelyek ízesítésként kizárólag aromát, adalékanyagokat, szén-dioxidot tartalmaznak, és amelyek nem tartoznak a Magyar élelmiszerkönyv 1-3-2001/112 Gyümölcslevek és hasonló termékek előírás hatálya alá, illetve a tejtermék italok közé. (URL¹)

2.1.2 Gyümölcsnektár fogalma

A Magyar Élelmiszerkönyv 1-3-2011/112 számú előírása alapján a gyümölcsnektár olyan erjeszthető, de nem erjesztett termék, amely gyümöcsléhez és koncentrátumból előállított gyümöcsléhez, sűrített gyümöcsléhez, vízzel extrahált gyümöcsléhez, dehidratált/porított gyümöcsléhez, gyümölcspüréhez, sűrített gyümölcspüréhez, illetve e termékek keverékéhez víz és cukor, illetve méz hozzáadásával, vagy anélkül készül és megfelel „Gyümölcsnektárokra vonatkozó különleges rendelkezések” rész előírásainak.

2.1.3 Jeges tea fogalma

Olyan alkoholmentes ital, amely 12%-nál kevesebb gyümölcslevet, növényi kivonatot, vagy ezek keverékét, vagy amely ízesítésként kizárólag aromát tartalmaz. (URL¹)

2.1.4 Energiailal fogalma

Hazánkban a 2011. évi. CIII törvény határozza meg az energiailalok fogalmát. Ennek értelmében az energiailal metil-xantint (koffein) és taurint tartalmaz. A törvény egyúttal azt is meghatározza, hogy amennyiben a termék koffeintartalma nem haladja meg a 15mg/100ml mennyiséget, nem nevezhető energiailalnak.

2.1.5 Fogyasztási szokások

Napjainkban egyre inkább elterjedt az üdítőitalok fogyasztása főleg a fiatalok körében, derül ki a WHO aktuális felméréséből (Anonymus, 2014). Hazánkban a férfiak 29%-a és a nők 23%-a fogyaszt naponta legalább egyszer üdítőitalt. Egy másik kutatás szerint, amit 2019-ben végeztek az EU-ban, a 15 éves és annál idősebbek 9%-a fogyaszt naponta üdítőitalt, míg 6%-uk hetente 4-6 alkalommal, 19%-uk pedig hetente 1-3 alkalommal (Anonymus, 2021). Európában Belgium a legnagyobb üdítőital fogyasztó ország, ahol a népesség 15 éves, vagy annál idősebb tagjainak a 20%-a fogyaszt naponta üdítőitalt. Ez közel 10%-kal nagyobb az EU-s átlagnál. A felmérésen negyedik helyen Magyarország végzett. Hazánkban az üdítőital fogyasztás 2%-al meghaladta EU-s fogyasztást. Általánosan megfigyelhető, hogy az életkor előre haladtával a fogyasztók százalékos aránya egyre csökken, egészen 75 éves korig. (Anonymus, 2022) A korábbi években a hagyományosnak mondható, cukortartalommal rendelkező üdítőitalok vezették a listát, de az elmúlt években elkezdtek a háttérbe szorulni, és helyüket a cukormentes/ZERO italok kezdi átvenni. (Anonymus, 2022) Napjainkban sokan az egészségtudatosság miatt fogyasztják ezeket a termékeket. Emiatt úgy tűnhet, hogy ezek a termékek teljesen ártalmatlanok és egészségesek. Ezzel a hiedelemmel szemben viszont kimutatták (Siqueira et al., 2021), hogy a cukormentes italok fogyasztása képes növelni a hyperuricaemia (magas húgysavszint) kockázatát. A magas húgysavszinttel kapcsolatban pedig kutatások igazolták, hogy több betegség okozója is lehet, mint például az inzulinrezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség, a magas vérnyomás, a stroke, a szívelégtelenség és a veseelégtelenség (Kékes, 2011).

2.2 Élelmiszer-technológiai adalékanyagok

A mai modern világban az élelmiszerek előállításához elképzelhetetlen a különféle adalékanyagoknak a használata. Ezek lehetnek tartósítószer, antioxidánsok, tápértéket javító adalékanyagok stb. Alkalmazásuk alapvető feltétele, hogy az emberi szervezetre teljesen ártalmatlanok legyenek, és hogy a használatuk a fogyasztó szempontjából előnyökkel járjon. Ilyen kedvező hatás például az élelmiszerek fogyaszthatósági időtartamának növelése, vagy az élvezeti érték és minőség javítása (Csapó és Csapóné, 2003).

2.2.1 Édesítőszer

Napjainkban a növekvő cukorbeteg és túlsúlyos egyének számának növekedése egyre inkább kiváltotta az érdeklődést a vércukorszintet mérsékelten növelő, illetve az energiamentes,

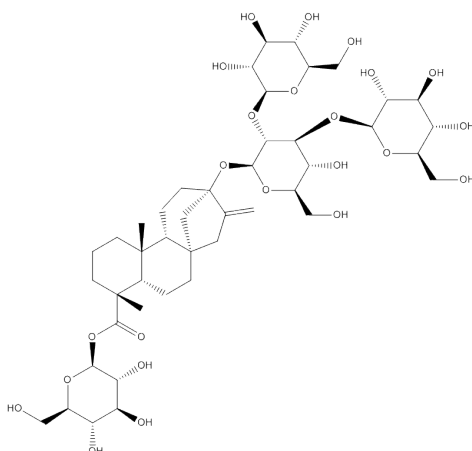
természetes és mesterséges édesítőszerre (Csapó és Csapóné, 2003). Az 1333/2008/EK rendelet értelmében az édesítőszer olyan adalékanyag, melyek édes ízt kölcsönöznek az élelmiszernek vagy asztali édesítőszernek. Két nagy csoportba sorolhatók: természetes és mesterséges édesítőszerre. A természetes és mesterséges édesítőszerre általánosságban elmondható, hogy nem fokozzák az étvágyat és nem befolyásolják a jóllakottságérzést. Hozzájárulnak az energia bevitel csökkentéséhez, ha magas energiatartalmú összetevők helyettesítésére használják. Ha testsúlycsökkentő program részeként az egészséges diétába illesztik, segíthetik a súlycsökkenést. Nem emelik a postprandialis vércukor- és inzulinszintet az egészséges és diabeteses személyekben. Eredményesen használhatóak ételek, üdítőitalok, fogpaszta és gyógyszerek édesítésére, mivel a fogszuvasodást megelőzését segítik és a száj savtartalmát nem fokozzák. (Hidvégi, 2016) A következőkben azokat az édesítőszerreket mutatom be, melyekkel kísérleteim során foglalkoztam.

2.2.1.1 Természetes édesítőszerre

Természetes édesítőszerre lehetnek növényi kivonatok, cukoralkoholok és monoszacharidok, melyek a természetben mind megtalálhatóak (Dóczi et al., 2020). Összességében olyan élelmiszer adalékanyagok, amelyeket az élelmiszerek édes ízének kialakítására, vagy asztali édesítőszerként használunk. Magyarországon kettő forgalomban lévő energiamentes édesítőszerre különböztetünk meg, a taumatint és a szteviol-glikozidokat. Vizsgálataim során ez utóbbival foglalkoztam.

Szteviol-glikozidoknak a *Stevia rebaudiana bertonii*, a Paraguayban őshonos édesfű, magyar nevén jázminpakóca leveléből származó, édes, diterpén-glikozidokat nevezzük (Lugasi, 2016). A növényben lévő hatóanyagok édesítő ereje mintegy 300-szorosa a szacharóznak. A szteviol a vízzel ürül, emellett nem halmozódik fel a szervezetben. Hasznos tulajdonsága továbbá a fogszuvasodást megelőző hatása (Dóczi et al., 2020). Hazánkban a szteviol-glikozidokat 2011 óta lehet alkalmazni édesítőszerként (1132/2011/EU rendelet).

A sztíviának két fő komponense van: szteviozid ($C_{38}H_{60}O_{18}$) és a rebaudiozid A ($C_{44}H_{70}O_{23}$) (Lindley, 2006). Vizsgálataim során az üdítőitalokban ez utóbbit vizsgáltam, melynek szerkezeti képletét az 1. ábra mutatja be.



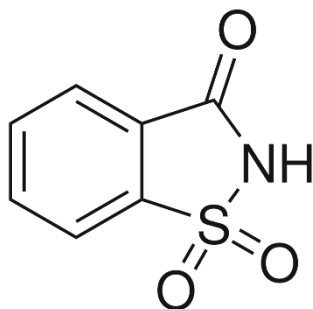
1. ábra: Rebaudiozid A szerkezeti képlete
Forrás (URL²)

Általában sóval tartósított élelmiszerekben találkozhatunk vele (pl. szószok), ugyanakkor megtalálható az üdítőkben, jégkrémekben, keserű italokban és a rágógumikban is. ADI értékét 4 mg/ttkg-ban határozták meg (Kiss és Takácsné, 2017).

2.2.1.2 Mesterséges édesítőszerek

Mesterséges édesítőszerek kémiai úton előállított, édes ízt adó anyagok. Megkülönböztetünk köztük energiát adó és energia mentes anyagokat (Dóczi et al., 2020). A mesterséges édesítőszerek megengedett napi beviteli értékkel (ADI) rendelkeznek, mely azt a napi maximális bevitt mennyiséget jelöli, amely alatt az édesítőszer fogyasztása nem okoz maradandó egészségügyi károsodást (Lugasi, 2016). Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy egyes fogyasztók érzékenyek lehetnek rá. Egy patkányokon végzett kutatás során például kimutatták, hogy az élethosszig tartó mesterséges édesítőszer fogyasztás gyulladásfokozó és rákkeltő hatású (Luo et al., 2019). Egy másik, egereken végzett kísérletben az állatok bélflórája megváltozott a mesterséges édesítőszerek hatására. (URL³). A kísérlet során az állatok 100, 300, 500 vagy 1000 mg/kg dózisban orálisan kapták meg az édesítőszer oldatot 12 héten keresztül.

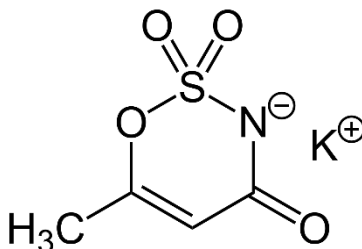
A **szacharin** (2. ábra) fehér, szagtalan, fémese ízű, kristályos anyag; édesítő ereje 200-300-szorosa a szacharóznak. $C_7H_5NO_3S$ összegképlettel jellemezhető, melyet hazánkban fitálsavból állítanak elő és E 954-es számmal jelölnek (Dóczi et al., 2020).



2. ábra Szacharin szerkezeti képlete
Forrás (URL⁴)

A szacharin tekinthető az első hivatalos mesterséges édesítőszernek. Alkalmazása 1977 óta engedélyezett; ADI értéke 5 mg/ttkg (Lugasi, 2016). Csökkentett energiatartalmú üdítőitalok, gyümölcslevek, dobozos vagy üveges gyümölcskonzervek, cukorkák, rágógumik, édességek készítéséhez használják. Szinergista hatással bír, ezért gyakran más édesítőszerrel együtt (pl. aszpartám) található meg az élelmiszerekben (Sohár, 2006).

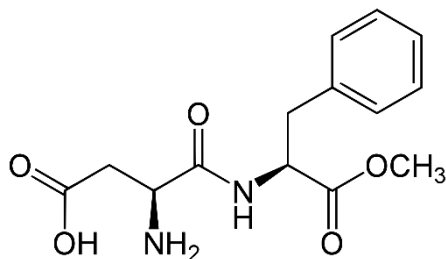
Az **aceszulfám-K** (3. ábra) $C_4H_4KNO_4S$ összegképlettel jellemezhető, hőálló, más édesítőszerrel jól társítható energiát nem adó édesítőszer, melyet E 950-es számmal jelölnek.



3. ábra Aceszulfám-K szerkezeti képlete
Forrás (URL⁵)

Édesítőértéke a szacharóznál 180-200-szor nagyobb (URL³), ugyanakkor amennyiben nagy mértékben alkalmazzák keserű mellékízt okoz (Eszterle, 2002). Beviteli értékét 1985-ben állatkísérleteket követően 9 mg/ttkg-ban határozták meg, majd ezt az értéket később 1991-ben 15 mg/ttkg-ra növelték (Ungár, 2012). Felhasználása széleskörű; megtalálható többek között tej- és tejtermékalapú italokban, üdítőkben, kakaó vagy szárított gyümölcs alapú édességekben, pudingporban és reggeliző-pelyhekben.

Az **aszpartám** (4. ábra) az aszparaginsav és a fenilalanin metilésztere; $C_{14}H_{18}N_2O_5$ összegképlettel jellemezhető és E 951-es számmal jelölik.



4. ábra Aszpartám szerkezeti képlete
Forrás (URL⁶)

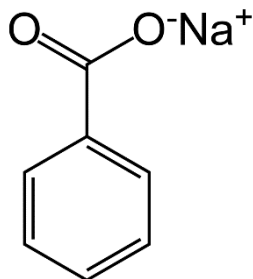
Általában más édesítőszerrel (pl. ciklamát, szacharin, aceszulfám-K) kombinálva alkalmazzák, ugyanis a keserű ízt kiemeli (Lugosi, 2016). ADI értéke 40 mg/ttkg; édesítőértékét pedig 200-szor nagyobbra határozták meg mint a szacharózét (Ungár, 2012) Felhasználják fagyaltok, jégkrémek, desszertek, alkoholmentes italok, rágógumik, leheletet frissítők, valamint apró édességek gyártásához

2.2.2 Tartósítószer

Az 1333/2008/EK rendelet értelmében a tartósítószer olyan anyagok, amelyek a mikroorganizmusok okozta romlás megakadályozásával meghosszabítják az élelmiszerek eltarthatóságát, és/vagy védelmet biztosítanak a kórokozó mikroorganizmusokkal szemben. Általános követelményen, hogy az alapélelmiszerek (pl. tej, hús) általában nem, a gyermekek részére szánt élelmiszerek pedig egyáltalán nem tartalmazhatnak ilyen anyagokat (Csapó és Csapóné, 2003). Tartósításnak nevezzük azt az eljárást, melynek során az élelmiszerben bekövetkező fizikai, kémiai, biokémiai és mikrobiológiai elváltozásokat próbáljuk késleltetni (Molnár, 2016). A tartósítószer működésének mechanizmusa, hogy adszorpcióval megkötődnek a mikroorganizmusok felszínén, majd a sejtmembránon keresztül a protoplazma fehérjéit módosítják, ezáltal megzavarva a mikrobasejt anyagcseréjét. A tartósítószer közül dolgozatomban csak azokat jellemzem, melyeket vizsgáltam.

2.2.2.1 Nátrium-benzoát jellemzése

A nátrium-benzoát (5. ábra) a benzoésav sója. Élelmiszeripari célra szintetikusan állítják elő kémiai úton benzoésavból (Tarnavölgyi, 2009).

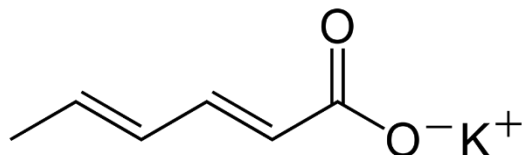


5. ábra: Nátrium-benzoát szerkezeti képlete
Forrás (URL⁷)

Tűszerű, vagy lemezes kristályokat képző vegyület, melyet E 211-es számmal jelölnek (Neumüller, 1958). Hatása pH függő, ezért csak az erősen savas termékek (pl. üdítőitalok, savanyúságok) tartósítására tudják alkalmazni (Tarnavölgyi, 2009). Hatásspektruma az élesztőkre és a penészekre terjed ki. A baktériumok szaporodásának gátlására más vegyületekkel (pl.: kálium-szorbát) való kombinációja által válik csak alkalmassá (Tarnavölgyi, 2009). Elfogadható napi beviteli mennyisége 5 mg/kg a benzoátok együttes koncentrációjára vonatkoztatva. Adagolási aránya 0,10-0,15 % (Csapó és Csapóné, 2003).

2.2.2.2 Kálium-szorbát jellemzése

A kálium-szorbát a szorbinsav sója. Fehér, kristályos anyag; összegképlete $C_6H_8O_2$ és E 202-es számmal jelölik. Hideg vízben alig, forró vízben azonban jobban oldódik. Könnyen köt meg halogéneket és halogénsavakat, valamint könnyen képez észtereket és amidokat (Neumüller, 1958). A kálium-szorbátot (6. ábra) a berkenyefa gyümölcséből izolálták először, viszont ipari felhasználásra szintetikusan állítják elő többlépcsős kémiai reakcióval szorbinsavból.

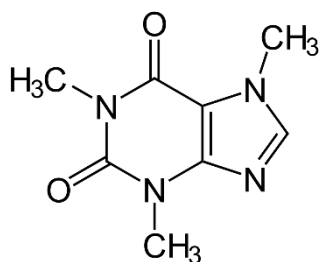


6. ábra: Kálium-szorbát szerkezeti képlete
Forrás (URL⁸)

Tartósításra élelmiszereknél, gyógyszereknél és kozmetikai készítményeknél használják (Tarnavölgyi, 2009). Az élelmiszeriparban leginkább gyümölcslevek, és üdítőitalok tartósítására használják 0,4-0,6 g/L mennyiségben (Kardos et al., 1963). Mikrobaellenes hatása csak az élesztőgombákkal szemben figyelhető meg, tehát szelektív tartósítószer. A penészekkel szemben savanyú közegben hatásosabb, mint a benzoesav (Csapó és Csapóné, 2003). A kálium-szorbát az egészségre ártalmatlan, elfogadható napi beviteli mennyisége 25 mg/kg a szorbinsav és az összes szorbát együttes mennyiségére. Ennek ellenére a mindennapokban előforduló jelenség a szorbinsav-érzékenység, mely leginkább allergiaszerű tünetekben (kiütések) mutatkozik meg (Tarnavölgyi, 2009).

2.3 Koffein

Az alkaloidok közé tartozó koffein (7. ábra) fehér, szagtalan, keserű ízű, finom kristályos porszerű anyag (Neumüller, 1958).



7. ábra Koffein szerkezeti képlete
Forrás (URL⁹)

Természetes formában megtalálható a kávé- és kakaóbabokban, a tealevelekben, a guaranabogyókban és a kóla diókban. Ugyanakkor üdítőitalokhoz, vényköteles és recept nélkül kapható gyógyszerek összetevőjeként is találkozhatunk vele. A koffein élettani hatása függ a szervezetbe vitt mennyiségtől. Kisebb mennyiségben (< 250 mg) serkentő hatással bír a szív működésre, az anyagcserére vagy az agy vérrellátására (Csapó és Csapóné, 2003). Az elfogyasztást követően a koffein az ideg és izomsejtek felületén fejti ki hatását. Befolyásolja számos enzim és ingerület átvivő anyag működését, és emellett gátolja a testünkben az adenosin hatást, ami fáradtságjelzőként funkcionál. A koffein egy másik jótékony hatása, hogy az idegrendszert serkenti, ezáltal befolyásolja a vérerek összehúzódását, ami megmagyarázza a fejfájáscsillapító hatását is. (MDOSZ, 2009) Ugyanakkor nagyobb mennyiségnél (> 300 mg) szívtáji nyomást, erős szívdobogást, vagy akár kézreszketest is okozhat. Halálos adagja kb. 5 g (Csapó és Csapóné, 2003). Néhány élelmiszer koffein tartalma a következő (MDOSZ, 2009):

- Egy csészényi (2 dl) hosszú kávéban átlag 90-180 mg,

- egy adag (0,5 dl) presszó kávéban 100 mg,
- egy csésze fekete teában 20-90 mg,
- egy csésze oolong teában 10-45 mg,
- egy csésze zöld teában 5-30 mg,
- egy pohár (2 dl) kólában 20-30 mg,
- egy szelet (kb.45 g) tejcsokiban 10-30 mg koffein van

Az 1169/2011/EU rendelete értelmében a koffeint az élelmiszerek címkéjén fel kell sorolni, amennyiben a termékben a mennyiség meghaladja 150 mg/L értéket. Aroma-anyagként elsősorban energia italokban, valamint kóla típusú üdítőitalokban alkalmazzák.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált vegyszerek

Az egyes analitikai standardokat (ACE-K ($\geq 99\%$), SAC ($\geq 98\%$), ASP ($\geq 98\%$), RBA ($\geq 96\%$), CAF (99%), SOR ($\geq 99\%$) és a BEN ($\geq 99,5\%$)) a Sigma-Aldrich (Magyarország), míg a foszforsavat (85%) és a kálium-dihidrogén-foszfátot (p.a. minőség) a Merck forgalmazta. Ezenkívül a vegyszerek, valamint a diétás, light és zero italok hígítására nagy tisztaságú (18 M Ω cm) ionmentes vizet használtam.

3.2 Alkalmazott analitikai berendezések

Az ACE-K, SAC, ASP, CAF, SOR, BEN és RBA kvalitatív és kvantitatív elemzését egy LaChrome 7000 típusú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) berendezéssel hajtottam végre (Merck Hithachi, Németország). A HPLC a következő részekből állt: szivattyú (L-7000), automatikus mintavevő (L- 7250), kolonna termosztát (L-7350) és diódasoros detektor (L-7450). Az adatok feldolgozása D-7000 HPLC System Manager 4.0 (HSM) szoftver segítségével valósult meg.

A gyümölcsnektárok előkészítéséhez egy Z206A típusú laboratóriumi centrifugát (Herle, Németország) alkalmaztam. A nagy tisztaságú ionmentesített vizet a Zeneer Power I rendszer állította elő (Human Corporation, Korea).

3.3 Kromatográfiás körülmények

Az elemzésekhez használt mozgófázis acetonitrilből (A) és foszfát pufferből (B; 12,5 mM pH-n) állt. Az optimalizált gradiens elúciós programot az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat Elemzéshez alkalmazott optimalizált HPLC-DAD program mozgófázisának összetétele

Időtartam (min)	Mozgófázis összetétele
0	5%A 95% B
10	50%A 50%B
15	50%A 50% B
16	5%A 95%B
21	5% A 95%B

Az áramlási sebesség 1,5 ml/perc, míg az oszlopra injektált mintatérfogata 10 μ l volt. A méréseket 30 °C-on végeztem. Az érzékelési hullámhossztartomány minden esetben 200 - 380 nm volt.

3.4 Minták és minta-előkészítés

Vizsgálataim során összesen 69 cukormentes (diétás, light és ZERO) italt elemeztem. A mintákat hazai szupermarketekből, valamint hazák egyik legnagyobb gyorséttermi láncból szereztem be. A mintákat a következő kategóriákba csoportosítottam: üdítőitalok (kóla, tonik, citrom, lime, narancs, gyömbér, szőlő, málna, görögdinnye, alma, meggy, áfonya, erdei gyümölcs, vénarancs és vegyes gyümölcs ízű), gyümölcsnektárok (alma, őszibarack, narancs, ananász, fehér szőlő és vegyes gyümölcs ízű), jeges teák (natúr, citrom és barack ízű) és energiasitalok (natúr, eper és őszibarack ízű).

A szénsavat tartalmazó italokat 15 percig ultrahanggal kezeltem a szén-dioxid eltávolítása érdekében; a gyümölcsnektárokat pedig 20 percig centrifugáltam (6000 g).

A HPLC-s mérésekhez az összes mintát nagytisztaságú vízzel ötszörösére hígítottam, majd egy 0,22 µm-es PVDF-es membránszűrőn 1,8 mL-es fiolákba szűrtem.

3.5 Rendszeralkalmassági teszt

A HPLC rendszer megfelelő teljesítményének igazolásához 20 µg/ml keverékstandard alkalmazásával értékeltam az egyes csúcsok retenciós idejét, kapacitás faktorát (k'), szelektivitását (α), felbontástát (R) és csúcsaszimmetriáját (A_s). Az elfogadási feltételeket (2. táblázat) a következők voltak:

2. táblázat Rendszeralkalmassági teszthez vizsgált paraméterek és azok elfogadási kritériumai

Vizsgált paraméter	Kritérium
kapacitás faktor (k')	≥ 1
szelektivitás (α)	> 1
felbontás (R)	$\geq 1,5$
Csúcsaszimmetria (A_s)	0,8 – 1,2

3.6 Analitikai módszer validálása

A kifejlesztett HPLC-DAD módszert a következő teljesítményjellemzőkre validáltam: linearitás, precizitás, pontosság, kimutatási határ (LOD) és meghatározási határ (LOQ).

A linearitás vizsgálatához individuális 1 mg/mL-es vizes törzsoldatokat állítottam elő, majd azokat szintén vízzel tovább hígítottam (5-80 és 5-100 µg/ml). A pontosságot három különböző koncentrációjú (5, 20 és 60 µg/ml) keverék standard oldat elemzéséve végeztem ugyanazon a napon (napon belüli) és három egymást követő napon (napok közötti). A pontosságot standard addíciós technikával határoztam meg, azaz egyes mintákhoz ismert

menyiségben analitokat tartalmazó törzsoldatot pipetáztam, és az eredményeket a következőképpen számítottam ki:

$$\text{Visszanyerés\%} = \frac{c_{\text{adalékolt minta}} - c_{\text{eredeti minta}}}{c_{\text{analit}}} \times 100 \quad (1)$$

Ahol: $c_{\text{adalékolt minta}}$: adalékolt minta koncentrációja (mg/L)

$c_{\text{eredeti minta}}$: eredeti minta koncentrációja (mg/L)

c_{analit} : hozzáadott analit koncentrációja (mg/L)

A LOD-t és a LOQ-t a meredekség és a standard hiba regressziós adatai alapján becsültem meg.

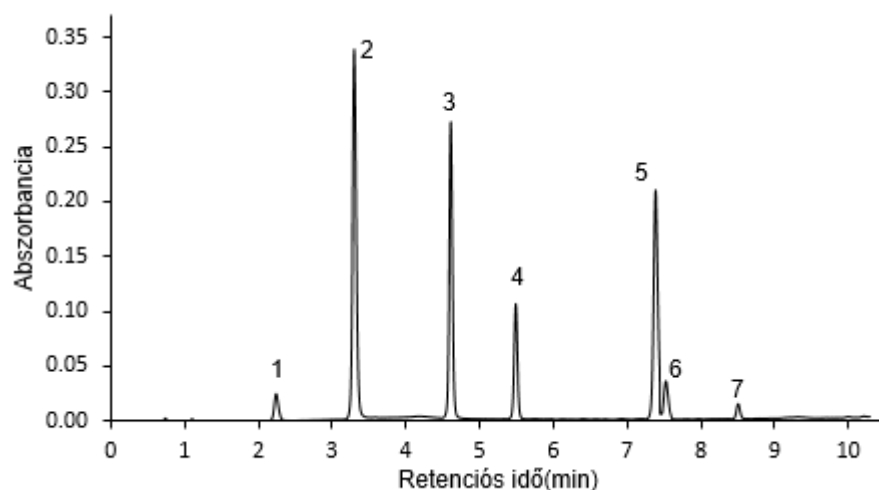
Ezenkívül a diódasoros detektort (DAD) a csúcstisztaság ellenőrzésére használtam.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 Kromatográfiás elválasztás optimalizálása

A HPLC-DAD módszer kidolgozásakor elsőként egy izokratikus elválasztási módszert választottam. A módszernek ugyanis számos előnye van, pl: költséghatékony, egyszerű, nincs szükség a rendszer újra egyensúlyozására az egyes minták injektálási között. A kezdeti elválasztási körülményeket és a mozgófázis-összetételt úgy választottam meg, hogy hasonlóak legyenek Serdar et al. (2011) által közöltekkel. Ennek megfelelően a mérésekhez egy 150 mm hosszú C18-as (Kromasil®) oszlopot választottam, mely 4,6 belső átmérővel és 5 µm szemcsemérettel rendelkezett. A mozgófázis acetonnitrilből (15%) és foszfát pufferből (85%; pH = 3,3) állt. Az áramlási sebesség pedig 1,0 ml/perc volt. Az elválasztási eredmények azonban azt mutatták, hogy ezek a körülmények nem biztosítottak kielégítő elválasztást, ugyanis az egyes komponensek túl korán elúálódtak az oszlopról, azaz nem kaptam kielégítő visszatartást. Ezért a kezdeti 15%-os acetonnitril koncentrációt 10%-ra csökkentettem. Bár az acetonnitril százalékos csökkentése növelte a csúcsok visszatartását az oszlopon, a kapott értékek, különösen az első eluált csúcs esetében (ACE: 0,44) nem voltak elfogadhatók. Ráadásul az elválasztás ideje is meghosszabbodott és néhány csúcs nagyon távol volt egymástól. Sőt, a BEN és a SOR nem váltak el egymástól.

Köztudott, hogy a mozgófázis összetételének változtatásával jobb k' értékek (visszatartás) érhetők el (Islam et al., 2019). Ezért végül úgy döntöttem, hogy az izokratikus módszer helyett gradiens módszert használok, melynek az optimalizálást a következőképp végeztem el. A kezdeti acetonnitril koncentrációt (5%) 50%-ra növeltem 10 perc alatt, majd a mérést 20 percig futattam 1 mL/min áramlási sebességgel. A kromatogramon mintegy 15 perc elteltével az összes csúcs elkülönült. A módszer meggyorsítása végett az áramlási sebességet 1,5 ml/perc-re növeltem. Amint a 8. ábrán látható, optimalizált körülmények között az összes célanalitot sikerült elválasztani kevesebb, mint 9 perc alatt. Összességében a kidolgozott módszer gyorsabb, mint amelyet korábbi tanulmányokban leírtak (Imanulkhan et al. 2020; Lorenzo et al. 2015; Lino et al. 2010).



8. ábra Az optimalizált módszert kapott 20 µg/mL-es standard oldat kromatogramja 202 nm hullámhosszon. 1: ACE, 2: SAC, 3: CAF, 4: ASP, 5: BEN, 6: SOR, 7: RBA

4.2 Rendszeralkalmassági teszt

A validálási kísérletek előtt ellenőriztem, hogy az optimalizált HPLC rendszer alkalmas-e elfogadható minőségű adatok produkálására. Erre a célra egy standard keverék oldatot használtam. A 3. táblázat az optimalizált módszerrel kapott értékeket mutatja be.

3. táblázat Rendszeralkalmassági teszt eredményei

Paraméterek	ACE	SAC	CAF	ASP	BEN	SOR	RBA
Retenció idő (min)	2,29	3,32	4,64	5,48	7,31	7,48	8,50
A retenció idő relatív szórása (%)	0,42	0,29	0,31	0,38	0,34	0,28	0,39
Kapacitás faktor (k')	1,03	1,96	3,16	3,92	5,68	5,74	6,58
Szelektivitás (α)	-	1,91	1,62	1,24	2,78	2,85	1,16
Felbontás (R)	-	10,7	15,4	10,6	19,5	1,46	10,1
Csúcsszimmetria (As)	1,12	1,10	1,05	1,03	1,19	1,03	1,09

Habár a gradiens program az izokratikus elválasztáshoz képest hatékonyabbnak bizonyult, a A BEN és a SOR alapvonalon történő elválasztását továbbra sem sikerült elérni. Az így kapott R-érték (1,46) azonban még így is mintegy 97%-os elválasztást eredményezett, ráadásul a BEN és SOR csúcsok tisztasági elemzése sem mutatott átfedést. Továbbá a legtöbb esetben a vizsgált italokban ezek a tartósítószeres külön-külön voltak jelen. Amint az a 4. táblázatban látható, az összes többi paraméter a megfelelő tartományon belül volt. Ennek alapján a módszert elfogadhatónak ítélt a validálás folyamatához.

4.3 HPLC módszer validálása

A HPLC eljárások validálása kulcsfontosságú szempont annak igazolására, hogy az alkalmazott módszer hatékony és megbízható a mérésekhez. Az optimalizált HPLC-DAD módszer teljesítményjellemzőinek eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Optimalizált HPLC-DAD módszer teljesítményjellemzői

Paraméterek	ACE	SAC	CAF	ASP	BEN	SOR	RBA
A_{max} (nm)	227	202	273	202	230	260	202
Linearitási tartomány (µg/mL)	5-80	5-80	5-80	5-100	5-80	5-100	5-100
Meredekség	9 840	34 806	8 283	8 927	13 772	31 907	1 286
Meredekség szórása	810	811	214	204	105	588	20,2
Metszéspont	-2 694	-39 717	-5 505	-8 215	-139	-17 755	-255
Metszéspont szórása	12 612	37 242	9 608	11 450	4 698	33 037	1 122
Determinációs együttható (R²)	0,9995	0,9997	0,9996	0,9996	1,0000	0,9998	0,9998
LOD (µg/mL)	3,84	3,21	3,48	3,85	1,00	3,11	2,62
LOQ (µg/mL)	12,8	10,7	11,6	12,8	3,41	10,4	8,73
Tisztasági faktor	0,9998	0,9993	0,9991	0,9996	0,9994	0,9999	0,9989
Visszanyerés (%)	94,8	95,5	97,0	94,1	96,3	99,2	98,6

Összességében jó linearitást figyeltem meg. A kalibrációs egyenesek determinációs együtthatói ($R^2 \geq 0,9995$) egyértelműen alátámasztják, hogy az alkalmazott HPLC módszer alkalmas az ACE, SAC, CAF, ASP, BEN, SOR és RBA mennyiségi meghatározására cukormentes italokban.

A 4. táblázat a LOD és LOQ értékeket is bemutatja. Ebben az esetben az érzékenység kielégítőnek bizonyult mindegyik analit tekintetében, mivel a LOD-k alacsonyabbak voltak a kalibrációs görbe dinamikus intervallumában tesztelt legkisebb standard koncentrációhoz képest. A visszanyerési értékek szintén megfelelőek voltak a tervezett célokhoz. A legkisebb visszanyerési értéket az ASP (94,1%), míg a legnagyobbat a SOR (99,2%) esetében kaptam. A csúcs-tisztaság értékelése kimutatta a kromatogramban nincsenek átfedő csúcsok. Ez a vizsgálat szintén alátámasztotta a módszer alkalmasságát az ACE, SAC, CAF, ASP, BEN, SOR és RBA egyidejű elemzésére cukormentes italokban.

Elemeztem továbbá a napon belüli és a napok közötti pontosságot is (5. táblázat). A relatív szórás (RSD%) 2,49% alatt volt mind a napon belüli, mind a napok közötti mérések megismételhetőségének tekintetében. Általánosságban elmondható, hogy a teljesítményjellemzők eredményei azt mutatták, hogy az optimalizált HPLC-DAD módszer

kellően precíz, pontos és megbízható a cukormentes italokban jelenlévő vizsgált analitok egyidejű mérésére.

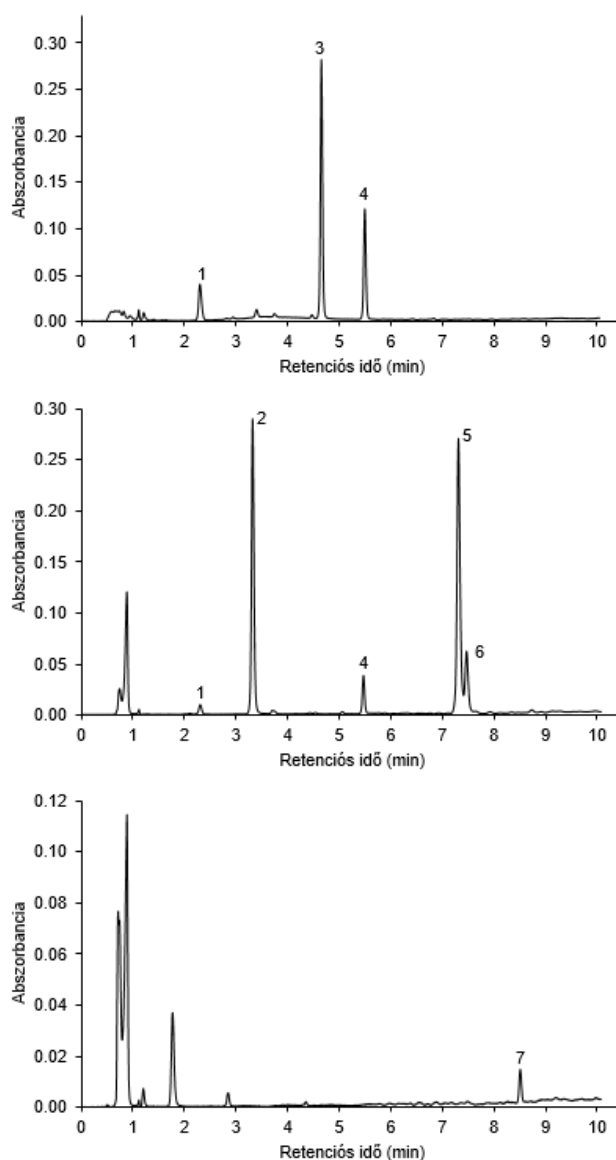
5. táblázat Napon belüli és napok közötti pontosság eredményei

Vizsgált komponens	Névleges koncentráció (µg/mL)	Napon belüli pontosság			Napok közötti pontosság		
		Mért (µg/mL)	RSD (%)	Pontosság (%)	Mért (µg/mL)	RSD (%)	Pontosság (%)
ACE	5	5,03	0,04	101	4,99	0,42	99,8
	20	20,1	0,91	100	19,9	0,76	99,3
	60	60,0	2,17	100	59,4	0,19	98,9
SAC	5	5,47	0,25	109	5,37	0,52	107
	20	19,3	0,40	96,5	19,2	0,31	96,2
	60	58,6	1,92	97,7	58,5	0,94	97,5
CAF	5	5,37	1,46	107	5,25	0,10	105
	20	19,7	0,81	98,7	19,6	0,16	97,9
	60	60,1	2,49	100	59,0	0,12	98,4
ASP	5	5,60	0,84	111	5,46	0,46	109
	20	19,8	1,25	99,2	19,6	0,41	98,2
	60	57,3	1,44	95,5	58,0	0,02	96,7
BEN	5	5,65	0,39	113	5,55	0,20	109
	20	19,9	0,15	99,3	19,7	0,27	98,5
	60	60,0	0,11	100	59,6	0,12	99,4
SOR	5	5,48	0,52	110	5,41	0,49	108
	20	20,5	0,76	98,6	19,3	0,02	96,4
	60	59,1	0,18	98,4	58,8	0,53	97,9
RBA	5	5,23	0,49	105	5,09	0,08	102
	20	19,9	0,33	99,5	19,5	0,28	97,6
	60	60,3	0,36	100	59,3	0,14	98,8

4.4 A minták elemzése

A 9. ábrán is látható, hogy az optimalizált módszert sikeresen alkalmaztam az ACE, SAC, CAF, ASP, BEN, SOR, és CAF egyidejű elválasztására cukormentes italokban. A vizsgált édesítőszerek közül az ACE-t fordult elő leggyakrabban (62 minta) a vizsgált mintából. A kapott eredmények $16,0 \pm 0,18$ mg/l és $238 \pm 5,82$ mg/l közötti koncentrációban változtak. A RBA-t ($78,6 \pm 0,36 - 103 \pm 2,41$ mg/L) négy mintában azonosítottam. Az ASP-ot ($42,2 \pm 0,12 - 490 \pm 6,44$) és SAC-t ($12,3 \pm 0,14 - 86,0 \pm 2,06$) rendre 22, valamint 9 mintában azonosítottam. Összességében az SAC-re kapott koncentrációk kisebbek voltak, mint Bangladesben (Shoeb et al., 2022) és Brazíliában (Bergamo et al., 2010). Ugyanakkor a Törökországban (Sezgin et al., 2021) és Lengyelországban (Zygler et al., 2011) végzett kísérletek hasonló eredményeket tártak fel az ACE-ra és az ASP-ra vonatkozóan, mint amelyet

a vizsgálataimban is tapasztaltam, A BEN-t és a SOR-t egyidejűleg 11 mintában, külön-külön pedig 10 mintában detektáltam, Összességében a BEN és a SOR koncentrációja 22,2 és 150 mg/l között volt (átlag érték: $112 \pm 0,88$ mg/L), illetve 49,7-278 mg/L (átlagérték: $168 \pm 1,20$ mg/L), Portugáliában Lino et al, (2010) úgy találta, hogy a BEN-ot gyakrabban használták tartósítószerként, mint SOR-ot, A szerzők által mért értékek 91 és 172 mg/L között voltak, az átlagos értéket pedig 158 ± 39 mg/L-re becsülték a BEN esetében, Ezzel szemben a SOR koncentrációja 78 és 350 mg/L között változott, az átlagos becsült mennyiség pedig 172 ± 96 mg/L volt,



9. ábra Optimalizált módszerrel felvett cukormentes üdítőitalok kromatogramja 202 nm hullámhosszágon, 1: ACE, 2: SAC, 3: CAF, 4: ASP, 5: BEN, 6: SOR, 7: RBA

A CAF-t 24 mintában sikerült azonosítanom ($32,5 \pm 0,16 \text{ mg/L}$ és $328 \pm 0,32 \text{ mg/L}$), A várakozásoknak megfelelően az energiatalkok tartalmazták a legtöbb CAF a vizsgált koffeintartalmú italok közül, átlagosan $310 \pm 1,56 \text{ mg/L}$ koncentráció értékkel, Al-Bratty et al, (2020) kimutatták, hogy a szaúd-arábiai piacon kapható italokban a CAF mennyisége 208 és 337 mg/L között található, A szénsavas üdítőitalok csoportjába tartozó kólák CAF tartalma $86,6 \pm 0,61 \text{ mg/L}$ – $110 \pm 2,11 \text{ mg/L}$ tartományban mozogtak, Ezek a megállapítások hasonlóak voltak azokhoz az eredményekhez, melyet Grembecka et al, (2012) kaptak vizsgálatuk során, A legalacsonyabb CAF szintet a jeges teákban mértem, A mérésekből kapott mg/L -ben kifejezett koncentrációkat a 6. táblázat tartalmazza,

6. táblázat A vizsgált analitok koncentrációja, Az adatok átlagértékek, $n=3$; a különböző betűk ugyanazon márka különféle termékeit jelölik; n.d. - nem található; - azt jelenti, hogy a gyártók nem használták fel termékeikben a célanalítot; * a gyorsétterem termékeit jelöli

Minta	Koncentráció (mg/L)						
	ACE	SAC	CAF	ASP	BEN	SOR	RBA
FD01 ^a	$148 \pm 0,68$	-	$97,2 \pm 0,25$	$109 \pm 0,26$	-	-	-
FD02 ^a	$110 \pm 0,61$	-	$86,6 \pm 0,61$	$203 \pm 2,01$	-	-	-
FD03 ^a	$151 \pm 0,75$	-	$98,7 \pm 0,56$	$113 \pm 0,32$	-	-	-
FD04 ^{a*}	$39,9 \pm 0,45$	-	$88,9 \pm 1,43$	$344 \pm 4,54$	-	n.d.	-
FD05 ^a	$40,3 \pm 0,41$	-	$93,2 \pm 0,28$	$352 \pm 3,05$	-	-	-
FD06 ^a	$146 \pm 0,87$	-	$95,7 \pm 0,34$	$112 \pm 0,29$	-	-	-
FD07 ^b	$34,9 \pm 0,77$	-	$110 \pm 2,11$	$437 \pm 7,95$	-	-	-
FD08 ^b	$34,5 \pm 0,12$	-	$106 \pm 0,54$	$490 \pm 6,44$	-	-	-
FD09 ^b	$39,2 \pm 0,68$	-	$104 \pm 1,89$	n.d.	-	-	-
FD10 ^b	$142 \pm 2,33$	-	$92,2 \pm 1,74$	$109 \pm 2,79$	-	-	-
FD11 ^c	$91,4 \pm 0,83$	-	$124 \pm 0,82$	-	-	-	-
FD12 ^d	$98,9 \pm 0,98$	-	$132 \pm 1,46$	-	-	-	-
FD13 ^{e*}	$145 \pm 1,50$	-	-	$224 \pm 2,72$	$150 \pm 1,80$	-	-
FD14 ^e	-	$41,8 \pm 0,81$	-	$116 \pm 0,84$	-	-	-
FD15 ^{f*}	$78,3 \pm 0,60$	-	-	$71,6 \pm 0,97$	$22,2 \pm 0,16$	$49,7 \pm 0,84$	-
FD16 ^f	$196 \pm 1,66$	-	-	-	-	$197 \pm 2,10$	-
FD17 ^f	$86,0 \pm 2,06$	$30,0 \pm 0,35$	-	-	-	$183 \pm 3,77$	-
FD18 ^g	$238 \pm 5,82$	-	-	-	-	-	-
FD19 ^g	$182 \pm 3,47$	-	-	-	-	$157 \pm 2,39$	-
FD20 ^h	$41,3 \pm 1,03$	-	-	-	-	-	-
FD21 ^h	$60,6 \pm 0,68$	-	-	-	-	-	-
FD22 ⁱ	$16,8 \pm 0,18$	$27,5 \pm 0,39$	-	-	-	-	-
FD23 ⁱ	$17,3 \pm 0,08$	$28,2 \pm 0,07$	-	-	-	-	-
FD24 ⁱ	$14,3 \pm 0,28$	$22,8 \pm 0,05$	-	-	-	-	-
FD25 ⁱ	$19,0 \pm 0,06$	$12,3 \pm 0,14$	-	-	-	-	-
FD26 ⁱ	$16,0 \pm 0,11$	$25,9 \pm 0,45$	-	-	-	-	-
FD27 ^j	$35,5 \pm 0,14$	$75,2 \pm 0,69$	-	$37,2 \pm 0,08$	$120 \pm 0,06$	$153 \pm 0,22$	-
FD28 ^j	$112 \pm 0,09$	-	-	$113 \pm 0,69$	$119 \pm 1,00$	-	-

Minta	Koncentráció (mg/L)						
	ACE	SAC	CAF	ASP	BEN	SOR	RBA
FD29 ^j	-	-	-	153 ± 3,03	120 ± 2,15	-	-
FD30 ^k	-	65,3 ± 0,15	-	42,2 ± 0,12	-	-	-
FD31 ^l	44,8 ± 0,70	-	-	-	-	-	-
FD32 ^l	42,8 ± 0,57	-	-	-	-	-	-
FD33 ^l	45,9 ± 0,27	-	-	-	-	-	-
FD34 ^m	55,3 ± 0,20	-	-	51,9 ± 0,26	128 ± 0,40	172 ± 0,76	-
FD35 ⁿ	47,7 ± 1,35	-	-	58,9 ± 1,22	-	148 ± 2,19	-
FD36 ^o	66,3 ± 0,29	-	-	58,9 ± 0,23	-	118 ± 0,63	-
FD37 ^ö	-	-	-	-	-	-	80,2 ± 1,14
FD38 ^ö	-	-	-	-	-	-	103 ± 2,41
FD39 ^ö	-	-	-	-	-	-	78,6 ± 0,36
FD40 ^ö	-	-	-	-	-	-	83,3 ± 0,77
FD41 ^p	65,7 ± 0,88	-	-	70,2 ± 0,33	115 ± 2,24	199 ± 3,21	-
FD42 ^p	68,8 ± 0,76	-	-	67,1 ± 0,54	128 ± 1,99	193 ± 2,36	-
FD43 ^p	68,4 ± 0,21	-	-	65,2 ± 0,22	127 ± 0,36	199 ± 1,21	-
FD44 ^q	59,5 ± 0,40	-	-	-	-	200 ± 3,51	-
FD45 ^q	77,5 ± 0,40	-	-	-	129 ± 2,67	87,9 ± 0,76	-
FD46 ^q	69,0 ± 0,69	-	-	-	-	234 ± 1,03	-
FD47 ^q	63,8 ± 2,15	-	-	-	-	232 ± 0,92	-
FD48 ^r	140 ± 0,13	-	-	-	-	200 ± 2,73	-
FN01 ^s	42,9 ± 0,47	-	-	-	-	-	-
FN02 ^s	86,2 ± 0,59	-	-	-	-	-	-
FN03 ^s	45,0 ± 0,18	-	-	-	-	-	-
FN04 ^s	42,5 ± 0,54	-	-	-	-	-	-
FN05 ^s	44,7 ± 0,18	-	-	-	-	-	-
FN06 ^t	58,9 ± 0,84	-	-	-	-	-	-
FN07 ^t	130 ± 0,58	-	-	-	-	-	-
FN08 ^t	82,8 ± 0,55	-	-	-	-	-	-
FN09 ^t	98,8 ± 0,64	-	-	-	-	-	-
IC01 ^{*ty}	31,5 ± 0,23	-	48,6 ± 0,34	-	64,6 ± 0,18	73,8 ± 0,07	-
IC02 ^{*ty}	50,5 ± 0,91	-	47,8 ± 0,69	-	63,7 ± 1,06	72,9 ± 0,13	-
IC03 ^{ty}	203 ± 4,31	-	54,9 ± 0,83	-	-	-	-
IC04 ^{ty}	32,7 ± 0,50	-	52,5 ± 0,89	-	-	-	-
IC05 ^{ty}	55,5 ± 0,28	-	39,5 ± 0,10	-	-	-	-
IC06 ^u	23,3 ± 0,24	-	54,2 ± 0,96	-	-	-	-
IC07 ^v	66,5 ± 0,41	-	32,5 ± 0,16	-	-	-	-
IC08 ^v	65,4 ± 0,54	-	35,3 ± 0,15	-	-	-	-
ED01 ^w	172 ± 0,37	-	328 ± 0,32	n.d.	-	-	-
ED02 ^x	27,0 ± 0,14	-	319 ± 3,98	-	-	-	-
ED03 ^y	49,7 ± 0,70	-	297 ± 1,46	-	141 ± 0,91	276 ± 2,50	-
ED04 ^z	49,1 ± 0,36	-	296 ± 1,23	-	143 ± 0,79	278 ± 0,18	-

A kapott eredményeim az Európai Parlament és Tanács 1333/2008/EK rendelete szerint is értékeltem, Ez a rendelet a BEN és a SOR italokban való használatát 150 mg/L -ig, illetve 300 mg/L-ig szabályozza, Továbbá kimondja, hogy a maximum SOR koncentráció 250 mg/L lehet abban az esetben amennyiben azt BEN-al együtt alkalmazzák, Mesterséges édesítőszeres esetében az ACE, ASP és SAC maximális megengedett koncentrációja rendre 350 mg/L, 600 mg/L és 80 mg/L, Fontos megemlíteni, hogy EU-ban nincs törvényi korlát az üdítőitalokban lévő CAF maximális mennyiségére vonatkozóan, Ugyanakkor a fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról szóló 1169/2011 rendelete - amely 2014 decemberében lépett hatályba - kimondja, hogy 150 mg/L koncentrációnál nagyobb CAF tartalmú az italok (energiaitalok) esetében fel kell tüntetni a „Magas koffeintartalom” szöveget, Eredményeim alapján elmondható (6, táblázat), hogy a mért koncentrációk megfeleltek az EU követelményeinek, kivéve a szteviol-glikozidokat, Ebben az esetben a megengedett ugyanis a maximális megengedett szint 80 mg/L, Ugyanakkor ahogy azt a 6, táblázat is mutatja két mintában is nagyobb RBA szintet mértem (FD38 és FD40), Hasonló megfigyelést tett Diviš et al, (2020) is egy korábbi munkájukban, Továbbá a szakirodalom korábbi megfigyeléseihez hasonlóan (de Queiroz Pane et al, 2015; Diviš et al, 2020), a kvalitatív elemzés eredményei bizonyos esetekben nem egyeztek meg a címkén található specifikációkkal, Két esetben (FD09 és ED01) az ASP nem volt jelen a mintában habár a címkén, mint összetevő szerepelt, Továbbá az FD04-es minta SOR jelenlétét jelezte, noha a mintában nem volt detektálható,

5 Összefoglalás

A diétás italok piaca az elmúlt években egyre nagyobb mértékben növekszik annak a ténynek köszönhetően, hogy a fogyasztói szokások a nagy kalória tartalmú italok „egészségesebb” alternatívái felé irányulnak,

Munkám során egy gradiens HPLC-DAD módszert optimalizáltam négy édestőszert, két tartósítószer és a koffein egyidejű elválasztására, A kifejlesztett módszert a következő paraméterekre validáltam: rendszeralkalmasság, linearitás, precizitás, pontosság, kimutatási határ, meghatározási határ, Eredményeim alapján elmondható, hogy a kidolgozott módszer gyors, precíz, pontos és könnyen alkalmazható, A kapott eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a módszer alkalmas az ACE, SAC, CAF, ASP, BEN, SOR és RBA egyidejű mennyiségi meghatározására cukormentes üdítőitalokban, Az összes célanalít elválasztása rövid volt (<9 min), Összességében a módszer rutinelemzésre vagy olyan laboratóriumokban ajánljuk, ahol nem állnak rendelkezésre fejlett analitikai berendezése (pl, HPLC-MS, UHPLC-DAD),

A módszerrel összesen 69 mintát elemeztem, Néhány esetben azonban a kapott eredmények nem egyeztek a címkén szereplő információkkal, ami arra utal, hogy ezen a területen hatékonyabb minőségellenőrzésre van szükség,

6 Irodalomjegyzék

1. 1169/2011/EU rendelete a fogyasztók élelmiszerekkel kapcsolatos tájékoztatásáról, az 1924/2006/EK és az 1925/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet módosításáról és a 87/250/EGK bizottsági irányelv, a 90/496/EGK tanácsi irányelv, az 1999/10/EK bizottsági irányelv, a 2000/13/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv, a 2002/67/EK és a 2008/5/EK bizottsági irányelv és a 608/2004/EK bizottsági rendelet hatályon kívül helyezéséről, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:hu:PDF> (Letöltve: 2022,10,08)
2. 1333/2008/EK rendelet az élelmiszer adalékanyagokról <https://elelmiszerlanc.kormany.hu/download/c/11/31000/1333-2008-EK.pdf> (Letöltve: 2022,10,15)
3. 2011, évi CIII, törvény a népegészségügyi termékadóról <https://extranet.who.int/nutrition/gina/sites/default/filesstore/HUN%202011%20%C3%A9vi%20CIII,%20t%C3%B6rv%C3%A9ny.pdf> (Letöltve: 2022, 10, 25)
4. Al-Bratty, M., Alhazmi, H,A., úr Rehman, Z., Javed, S,S,, Ahsan, W., Najmi, A., Khuwaja, G., Makeen, H,A., Khalid, A, (2020), Determination of caffeine content in commercial energy beverages available in Saudi Arabian market by gas chromatography-mass spectrometric analysis, Journal of Spectroscopy, Article ID:3716343, <https://doi.org/10.1155/2020/3716343>
5. Anonymus (2014) Soft drink consupction (11, 13, 15 years), https://gateway.euro.who.int/en/indicators/cah_24-soft-drink-consumption-11-13-15-years/ (Letöltve: 2022, 10, 31)
6. Anonymus (2021) How often do you drink sugar-sweetened soft drinks? <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20210727-1?ettrans=hu> (Letöltve: 2022, 10, 31)
7. Anonymus (2022) Top selling soft drink by country 2022, <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/top-selling-soft-drinks-by-country> (Letöltve: 2022, 10, 31)
8. Az Európai Parlament és a Tanács 1333/2008/EK Rendelete (2008, december 16,) az élelmiszer-adalékanyagokról, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333 &from=FR> (Letöltve: 2022, 11, 02,)
9. Bergamo, A,B,, da Silva, J,A,F,, de Jesus, D,P, (2010), Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-k in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, Food Chemistry, 124, 1714-1717, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.107>
10. Csapó J, Csapóné K, Zs, (2003) Élelmiszer-kémia, Mezőgazda Kiadó, Budapest,

11. de Queiroz Pane D., Dias C,B., Meinhart A,D., Ballus C,A., Godoy H,T, (2015) Evaluation of the sweetener content in diet/light/zero foods and drinks by HPLC-DAD, *Journal of Food Science and Technology*, 52:6900-6913, <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1816-1>
12. Diviš P., Jurečková Z., Vespalcová M., Pořízka J., Punčochářová L, (2020) Simultaneous determination of sweeteners and preservatives in beverages by HPLC-DAD-ELSD, *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 14: 881-886, <https://doi.org/10.5219/1339>
13. Dóczi E., Hanczné L,E., Németh-Torkos A, (2020) A természetes és mesterséges édesítőszeres fogyasztói megítélése és azok alkalmazásának vizsgálata kérdőíves felmérés alapján, In: Makkos A., Fehér á., Pongrácz A, (szerk.) *Okos lét, innováció és digitalizáció – irányok, trendek és következmények, A XXIII, Apáczai-napok Tudományos Konferencia Tanulmánykötete*, Széchenyi István Egyetem Apáczai Csere János Kar, Győr
14. Eszterle M, (2022) A cukor és az édesítőszeres, *Cukoripar*, 55: 144-154
15. Grembecka M., Szefer P, (2012) Simultaneous determination of caffeine and aspartame in diet supplements and non-alcoholic beverages using liquid-chromatography coupled to corona cad and uv-dad detectors, *Food Anal Methods* 5: 1010-1017, <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9334-x>
16. Hidvégi T, (2016) Az energiamentes édesítőszeres hatása az egyes anyagcsere-paraméteres, *Orvosi Hetilap*, 157,8-13,
17. Imanulkhan, Setyaningsih W., Rohman A., Palma M, (2020) Development and validation of HPLC-DAD method for simultaneous determination of seven food additives and caffeine in powdered drinks, *Foods*, 9: 1119, <https://doi.org/10.3390/foods9081119>
18. Islam, J., Phukan, S., Chattopadhyay, P, (2019), Development of a validated RP-HPLC/DAD method for the quantitative determination of methyl jasmonate in an insect repellent semi-solid formulation, *Heliyon*, 5, e01775, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01775>
19. Jingyang Luo, Qin Zhang, Miao Cao, Lijuan Wu, Jiashun Cao, Fang Fang, Chao Li, Zhaoxia Xue, Qian Feng (2019) Ecotoxicity and environmental fates of newly recognized contaminants-artificial sweeteners: A review, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.445>
20. Kardos E., Gyönös K., Szenes E, (1963) *Konzervipari zsebkönyv*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest,
21. Kékes E., Kiss I, (2011) *Hyperuricaemia*, Budapest: Literatura Medica,
22. Kiss A., Takácsné h,M, (2017) A sztyvia (*Stevia rebaudiana* B,) hozamának alakulása a termesztéstechnológia függvényében, *Agrártudományi Közlemények*, 72: 71-77
23. Kiss, G, (2007) Alkoholmentes italok értékelése 2006-ban, *Alkoholmentes italok*, 1:4-5
24. Kreigel, D, (2015), Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms, *BioMed Research International*, 2015, 128697, <https://doi.org/10.1155/2015/128697>

25. Lindley M, (2006) Other sweeteners, In: Mitchell H, (szerk): Sweeteners and sugar alternatives in food technology, Blackweel Publishing, Oxford, UK,
26. Lino C,M,, Pena A,(2010) Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment, Food Chem, 121:503–508, <https://doi.org/10,1016/j.foodchem,2009,12,073>
27. Lorenzo, R,A,; Pena, M,T,; Fernández, P,; González, P,; Carro, A,M, (2015) Artificial sweeteners in beverages by ultra performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry, Food Control, 47:43–52, <https://doi.org/10,1016/j.foodcont,2014,06,035>
28. Lugosi A, (2016) Az intenzív édesítőszerbiztonságossága, Orvosi Hetilap, 157: 14-28,
29. Magyar Élelmiszerkönyv 1-3-2011/112 számú előírása a gyümölcslevekről és egyes hasonló, emberi fogyasztásra szánt termékekről
30. MDOSZ (2009) Élénk gondolkodás – A koffein és az egészség kapcsolatáról, Táplálkozási Akadémia Hírlevél II, évfolyam 2, szám, 2009 február, Magyar Dietetikusok Országos Szövetsége https://mdosz.hu/hun/wp-content/uploads/2016/03/ta_2009_02_koffein.pdf (Letöltve: 2022, 10, 29,)
31. Molnár X, (2016) Néhány szintetikus és természetes eredetű tartósítószer antimikrobiális tulajdonságainak összehasonlítása, 4,
32. Neumüller O,A, (1956) Römp vegyészlexikon, Műszaki Könyvkiadó, Budapest,
33. Pressman, P,, Clemens, R,, Hayes, W,, Reddy, C, (2017), Food additive safety: a review of toxicologic and regulatory issues, Toxicology research and Application, 1, 1-22,
34. Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive EFSA Panel on food additives and nutrient sources added to food, EFSA Journal 8:1537, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1537.pdf> (Letöltve: 2022, 10,28)
35. Serdar M,, Knežević Z, (2011) Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography, Arh, Hig, Rada Toksikol 62:169-173, <https://doi.org/10,2478/10004-1254-62-2011-2084>
36. Sezgin, B,, Arli, G,, Can, N,Ö, (2021), Simultaneous HPLC-DAD determination of seven intense sweeteners in foodstuffs and pharmaceuticals using a core-shell particle column, Journal of Food Composition and Analysis, 97, 103768, <https://doi.org/10,1016/j.jfca,2020,103768>
37. Shoeb, M,, Islam, M,M,, Reza, M,S,, Nahar, N,, Islam, M,M, (2022), HPLC analysis of artificial preservatives, stimulants and sweeteners in carbonated beverages in Bangladesh, Current Research on Biosciences and Biotechnology, 3, 215-221, <https://doi.org/10,5614/crbb,2022,3,2/2V2BWDB5>
38. Siqueira j,H,, pereira T,S,S,, Velasquez-Melendez G,, Barreto S,M,, Bensenor I,M,, Mill J,G,, Molina m,C,B, (2021) Sugar-sweetened soft drinks consumption: results of the ELSA-Brasil study, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 31: 2004-2013

39. Sohár P, (2006) Élelmiszer-adalékanyagok, Képzés egy életen át, 6: 7-14,
40. Tarnavölgyi G, (2009) A tartósítószer technológiai és humánegészségügyi vonatkozásai, Alkoholmentes italok, 43-46,
41. Temple, J,L, (2019), Review: trends, safety, and recommendations for caffeine use in children and adolescents, Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 58, 36-45,
42. Tireki S, (2021) A review on packed non-alcoholic beverages: ingredients, production, trends and future opportunities for functional product development, Trends in Food Science & technology, 112: 442-454
43. Ungár T, L, P, É, (2012) Édesítőszer hatásának vizsgálata in vivo biológiai rendszerekben, Doktori (PhD) értekezés, Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar Egészségtudományi Doktori Iskola
44. Zyglis A., Wasik A., Namiesnik J, (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs, TrAC Trend sin Analytical Chemistry, 28: 1082-1102,

Internetes hivatkozások

URL¹<https://elelmiszerlanc,kormany.hu/download/c/6a/c1000/Gy%C3%BCm%C3%B6lcsitalok%20%C3%A9s%20%C3%BCd%C3%ADt%C5%91italok.pdf>

URL² <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=5294031&w=250&h=250>

URL³ <https://www,healthline,com/nutrition/artificial-sweeteners-and-gut-bacteria>

URL⁴ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=4959>

URL⁵ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=55940&w=250&h=250>

URL⁶ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=118630&w=250&h=250>

URL⁷ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=10305&w=250&h=250>

URL⁸ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=4445644&w=250&h=250>

URL⁹ <http://www,chemspider,com/ImagesHandler,ashx?id=2424&w=250&h=250>

7 Rövidítésjegyzék

HPLC – nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

DAD – diódasoros detektor

ACE – aceszulfám-K

SAC – szacharin

ASP – aszpartám

CAF – koffein

BEN – nátrium-benzoát

SOR – kálium-szorbát

RBA – rebaudiozid A

FD – üdítőitalok

FN – gyümölcsnektárok

IC – jegesteák

ED - energiatotalok

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr, Sik Beatrix Tanár Nőnek a vizsgálatok kidolgozásában és végrehajtásában, valamint e dolgozat megírásában nyújtott sok segítségét és szakmai támogatását

Köszönöm továbbá a Széchenyi István Egyetem Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar Élelmiszertudományi Tanszék Élelmiszeranalitika Labor vezetőinek és munkatársainak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a labor berendezéseinek használatára,