

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 прецизоста 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 успоруват 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 95/2EC 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 киелина 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 дозволената 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 методи

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, 9 mg L⁻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, желето 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).

Масти од растително или анимално потекло и сосови: 0,1 g од мастите 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 купрени 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 колациња, 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 μm (Mahboubifar, 2010). **HPLC апаратура:** анализата е изведена со HPLC систем со UV детектор на собна температура. Елуирањето е изократско, а инјектираниот волумен изнесува 20 μL . Хроматографската колона на која е изведена анализата е C 18, 5 μm , 4,6 x 250 mm, брзината на проток е 0,8 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 mgL^{-1} а лимитот за квантификација е 0,772 mg L^{-1} . За калиум сорбат лимитот на детекција е 0,018 mgL^{-1} а лимитот за квантификација е 0,060 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 min. Идентификацијата на пиковите од примерокот е потврдена со UV спектрите (200-400 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 20-200 mgL^{-1} на и од калиум сорбат (10-1000 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
Масти	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
Масти	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

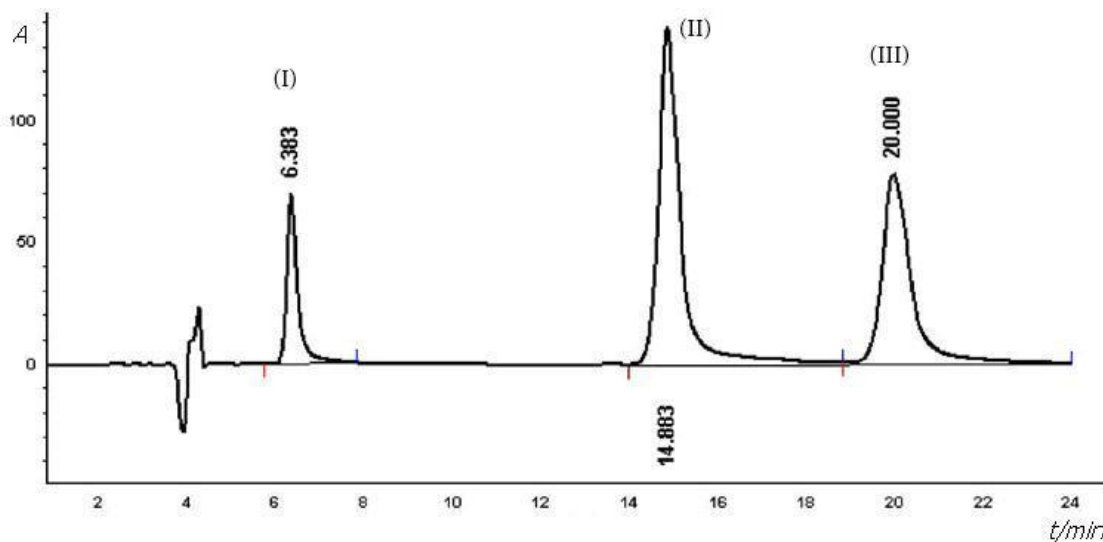
Линеарноста на HPLC методот е тестирана во концентрација од 1 до 550 mg/L за натриум бензоат и 1 до 1000 mg/L за калиум сорбат.

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 репродуктивилноста 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.

Повисокоите 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 интrefерираат 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 прилична 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.

Литература

1. Modic P., (2001). Uпотреba 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.

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.