

Tallinna Tervishoiu Kõrgkool
meditsiinitehnilise hariduse keskus

F3

Elina Hermann, Lilith Napp

**ASOVÄRVIDE KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE RAVIMITES JA
VEDELIKKROMATOGRAAFILISE MÄÄRAMISMEETODI VALIDEERIMINE**

Lõputöö

Tallinn 2019

Oleme koostanud lõputöö iseseisvalt. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite töödest, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

Lõputöö autorite allkirjad: Elina Hermann */Allkirjastatud digitaalselt/*
Lilith Napp */Allkirjastatud digitaalselt/*

Kuupäev: 30. mai 2019

Lubame Tallinna Tervishoiu Kõrgkoolil avalikustada lõputöö pdf versiooni raamatukoguprogrammis RIKSWEB (<http://riks.ttk.ee/>).

Lõputöö autorite allkirjad: Elina Hermann */Allkirjastatud digitaalselt/*
Lilith Napp */Allkirjastatud digitaalselt/*

Kuupäev: 30. mai 2019

Lubatud kaitsmisele.

Juhendaja: Laine Parts MSc
/Allkirjastatud digitaalselt/

Juhendaja: Lilian Ruuben MSc
/Allkirjastatud digitaalselt/

Kuupäev: 30. mai 2019

Kuupäev: 30. mai 2019

KOKKUVÕTE

Elina Hermann, Lilith Napp (2019). Tallinna Tervishoiu Kõrgkool, meditsiinitehnilise hariduse keskus, farmatseudi õppekava. Asovärvide kvantitatiivne määramine ravimites ja vedelikkromatograafilise määramismeetodi valideerimine. Lõputöö on 46 leheküljel, sisaldab 8 tabelit ning 10 joonist. Töös on kasutatud 69 kirjandusallikat.

Asovärve kasutatakse tänapäeval palju, igapäevaelus kasutatavatest värvidest moodustavad nad poole. Asovärvid võivad põhjustada allergiat, astmat ning hüperaktiivsust. Lõputöö eesmärgiks oli uurida asovärvide ohtlikkust, kasutusvaldkondi, seost antibakteriaalsete ainetega ning koguseid Eestis müüdatavates ravimites. Lõputöös analüüsiti asovärvide koguseid käsimüügiravimites ning tuvastatud asovärvide jäämist piirnormidesse.

Lõputöö on koostatud empiirilise uuringuna, mis viidi läbi Tallinna Tervishoiu Kõrgkooli instrumentaalanalüüsi laboris, kasutades kõrgsurve-vedelikkromatograafia aparatuuri. Proovide ettevalmistamisel kasutati “*Development and validation of an HPLC-UV method for determination of synthetic food colorants*” meetodikat. Referentsainete valik tehti käsimüügiravimites enim esinevate asovärvide alusel. Analüüsitavaid ravimpreparaate valikul lähtuti eelkõige lastele ja noortele sobilikest ravimitest ning lisaks võeti juurde preparaate, kus leidus analüüsitavaid asovärve. Täiskasvanutele mõeldud käsimüügiravimid valiti, kuna apteegis ostetakse neid tihti ning autorid peavad nendes asovärvide kasutamist ebavajalikuks.

Analüüsitud viie preparaadi referentsväärtused on avaldatud tervishoiu töötaja ravimiinfos (SPC) ning Dolmeni referentsväärtuse kohta tehti teabenõue ravimifirmasse. Meetodika valideerimisega selgitati välja asovärvainete määramise meetodika laiendatud mõõtemääramatus, milleks oli 35%. Tulemusi ning referentsväärtusi võrreldes selgus, et valitud ravimitest viis jäid piirnormidesse ning üks ei jäänud. Mõõtemääramatusel arvesse võttes ei jäänud piirnormidesse Theraflu SN. Dolmen sisaldas kinoliinkollast märgatavalt vähem ravimifirmalt saadud kogusest. Ülejäänud kaheksa preparaadi võrdlusmoment püstitati toidulisandite piirnormide alusel. Eestis lubatud asovärvide piirnormid on kajastatud Riigiteatajas. Tulemusi analüüsides selgus, et ülejäänud kaheksas preparaadis jäid asovärvid piirnormidesse.

Võtmesõnad: asovärvid, päikeseloojangukollane, asorubiin, erkpunane, briljantsinine, kinoliinkollane, prontosil, HPLC.

SUMMARY

Elina Hermann, Lilith Napp (2019). Tallinn Health Care College, Medical Technology Education Centre, Curriculum of an Assistant Pharmacist. Method validation and quantitative determination of azo dyes in drugs by using HPLC. The thesis consists of 46 pages, 8 tables, 10 figures and 69 references.

Azo dyes are widely used, they make up about half of the colours used in every day life. Azo dyes can cause allergies, asthma and hyperactivity. The purpose of the final thesis was to analyse the hazardousness of azo dyes, field of use, association with antibacterial substances and quantities of azo dyes in medicines sold in Estonia. The quantities of azo dyes in medicines were analyzed and the presence of them in the limit values were observed.

The thesis is an empirical study, which was carried out at Tallinn Health Care College's instrumental analysis' laboratory using high-pressure liquid chromatography (HPLC). Samples were prepared using "*Development and validation of an HPLC-UV method for determination of synthetic food colorants*" method. The choice of reference substances was based on the most used azo dyes in medicines and the choice of products was based on suitability for children and teens. Products suited for adults were chosen because they are more commonly bought and the authors find unnecessary to use azo dyes in them.

The reference values of the 5 analysed preparations are published in the summary of product characteristics (SPC) and Dolmen referencevalue was inquired through the pharmaceutical company. The expanded uncertainty which was 35% was found through the validation of the method. During the comparison of the results and reference points it was found that 5 of the products were in the limit values while 1 was not. Taking into account expanded uncertainty, Theraflu SN did not remain within the limit values. Dolmen contained quinoline yellow significantly less than the pharmaceutical company told. The comparison(s) of the remaining 12 preparations were set according to the limitations of the food supplements. The allowed limit values of azodyes in Estonia are recognized in the Riigiteataja. When analysing the results it was found that the azodyes in the remaining 8 preparations were in the limits.

Keywords: sunset yellow, azorubine, ponceau, brilliant blue, quinoline yellow, prontosil, HPLC.

SISUKORD

KOKKUVÕTE	2
SUMMARY	3
SISSEJUHATUS	5
MÕISTED	7
1. ASOVÄRVIDE KEEMILINE LOOMUS JA TOIME ORGANISMIS	9
1.1. Asovärvide toksikoloogia	9
2. ASOVÄRVIDE KASUTUSALAD	11
2.1. Farmaatsiatööstus.....	11
2.2. Toiduainetööstus	11
2.3. Kosmeetikatööstus	12
3. ASOVÄRVIDE SEOS ANTIBAKTERIAALSETE AINETEGA	13
3.1. Prontosil	13
4. PÄIKESELOOJANGUKOLLANE FCF	15
5. ASORUBIIN	17
6. ERKPUNANE 4R	18
7. BRILJANTSININE FCF	19
8. KINOLIINKOLLANE	20
9. UURIMISTÖÖ METOODIKA.....	22
9.1. Kirjanduse ülevaate meetodika.....	22
9.2. Valimi moodustamise meetodika	22
9.3. Analüütilise uuringu meetodika.....	23
9.4. Standardlahuste ettevalmistus	24
9.5. Lõputöös kasutatud ravimpreparaadid ning nende ettevalmistus analüüsiks	25
9.6. Kõrgsurve-vedelikkromatograaf	29
9.7. Andmete analüüsi meetodika.....	30
10. TULEMUSED	31
11. ARUTELU	37
JÄRELDUSED	40
KASUTATUD KIRJANDUS	41

SISSEJUHATUS

Süntheetilisi värve kasutatakse tekstiili värvimisel, printimisel, värvifotograafias, ravimitööstuses, toiduvalmistamisel, kosmeetikas ja paljudes muudes valdkondades (Erkurt 2010: 10). Terminit sünteetiline kasutatakse värvainete puhul, mis ei ole looduslikud ning on saadud keemilise sünteesi teel (Corradini 2019: 1). Kõik lisaained, k.a asovärvid on tähistatud lisaaine koodiga, mis hõlmab tähist E ning numbrilist koodi. Tähis E annab ohutuse garantii ning numbriline kood võimaldab lisaaineid süstematiseerida erinevatesse kasutusklassidesse. “Tähis E ja numbrikood viitavad konkreetsele keemilisele ühendile, mis on kantud toiduainetes kasutada lubatud lisaainete registrisse Euroopa Liidus.” (Vihalemm).

Asovärvid esindavad igapäevaelus kasutatavatest värvainetest poolt (Erkurt 2010: 10). Ühendite kasutatavus tuleneb nende lihtsatest sünteesiprotsessidest ning püsivusest nii niiskuse kui temperatuuri suhtes (Bafana jt 2011: 351). Enamik asovärve on vees lahustuvad, mis tähendab, et need imenduvad organismis kergesti (Azo dyes 2018). Tänapäeval sünteesitakse asovärve ülipuhastest naftasaadustest (Amchova jt 2015: 914). Kuigi asovärvid ei ole otseselt ohtlikud, võivad need vee-keskkonda sattudes muutuda kantserogeenseteks amiinideks, mis mõjutavad ökosüsteemi ning inimeste tervist (Erkurt 2010: 10). Laialdaselt on levinud uskumus, et toiduvärvid, kaasa arvatud asovärvid võivad tekitada toidutalumatust, allergilisi reaktsioone, hüperaktiivsust lastel, genotoksilisust ning kantserogeensust (Feketea ja Tsabouri 2017: 579; Corradini 2019: 1). Heakskiidetud sünteetiliste värvainete puhul ei ole teatatud kantserogeensusest ning genotoksilisest toimest, kuigi nende ainevahetusproduktide sarnasus potentsiaalselt kantserogeensete või genotoksiliste ühenditega on ulatuslik (Corradini 2019: 1).

Päikeseloojangukollane E110 on asovärvaine, mis sisaldab asogruppi $-N=N-$. E110 kasutatakse näiteks juustus, kommides, aprikoosimoosis, pakisuppides ning energiajookides. Päikeseloojangukollane võib põhjustada astmat, immunosupressiooni, ärevust, migreeni ja hüperaktiivsust. (Gómez jt 2016: 807-808). Asorubiin E122, teise sõnaga karmoisiin, on asovärv, mida kasutatakse laialdaselt toiduvärvina (Basu ja Kumar 2015: 54; Komisjoni rakendusmäärus... 2012). Inglise keeles tuntakse kui *Red 3* ning *Acid Red 14*. Tavaliselt esineb asorubiin dinaatriumsoolana ja seetõttu on see vees väga hästi lahustuv. On tõestatud, et karmoisiin avaldab rottide maksa- ja neerukudedele histopatoloogilist mõju, mis väljendub rakkude turses ja nekroosis. (Basu ja Kumar 2015:

54). Erkpunane on asovärv, mida kasutatakse laialdaselt paljudes toiduainetes. Peamine terviseprobleem erkpunase tarbimisega on mõju laste käitumisele, peamiselt hüperaktiivsus. (Abbey jt 2014: 460). Briljantsinine on asovärv, mis on E-ainena registreeritud kui E133. Paljudes riikides kasutatakse briljantsinist toiduvärvina, kaasa arvatud ka Euroopa Liidu riikides. (Wang jt 2019: 126; EFSA 2013: 4-6). Briljantsinist tuleks võtta sissehingamisel ohuna ning kuna puuduvad andmed naha ning silmade ärrituse kohta, siis tuleks pidada briljantsinist potentsiaalselt ärritavaks (EFSA 2013: 4). Kinoliinkollane (E104) on kollane või rohekaskollane asovärv. Kinoliinkollane on Euroopa Liidus heaks kiidetud värvaine ning seda kasutatakse enamasti toiduvärvina. (Wang jt 2019: 126; E-ainete tabel...). Kinoliinkollase tarbimise peamiseks kõrvaltoimeteks on allergilised tursed ning nõgestõbi (Vihalemm). Päikeseloojangukollase, asorubiini ja erkpunase ADI peaks jääma vastavalt 2,5 mg, 4 mg ja 4 mg kehakaalu kilogrammi kohta (Leo jt 2017: 36). Briljantsinise ADI 1969. aastal oli 12,5 mg/kg kehakaalu kohta, alates 1984. aastast aga 10 mg/kg kehakaalu kohta (Lucova 2013: 19). Kinoliinkollase ADI peaks jääma 0,5 mg kehakaalu kilogrammi kohta (EFSA 2009: 1).

Lõputöö eesmärgiks on uurida asovärvide sisaldust apteegis müügil olevates käsimüügiravimites. Ravimite valiku tegemisel lähtuti sobivusest lastele ning noortele ning lisaks võeti juurde käsimüügiravimeid, kus leidus analüüsitavaid asovärve. Täiskasvanutele mõeldud käsimüügiravimid valiti, kuna apteegis ostetakse neid tihti ning töö autorid peavad nendes asovärvide kasutamist ebavajalikuks. Kirjanduse alusel uurida asovärvide kasutusvaldkondi ning ohtlikkust. Sellest lähtuvalt püstitatakse lõputöö hüpotees, et apteegis müüdavates käsimüügiravimites on asovärve normi piires.

Lõputöö uurimisülesanded:

- tõenduspõhise kirjanduse alusel uurida asovärvide ohtlikkust;
- uurida asovärvide kasutusvaldkondi;
- uurida asovärvide kasutamist meditsiinis;
- välja selgitada farmaatsiatööstuses enim kasutatavad asovärvid;
- analüüsida kvantitatiivselt apteegis müüdavaid käsimüügiravimeid, mis sisaldavad asovärvi/asovärve;
- vedelikkromatograafilise määramismeetodi valideerimine;
- võrrelda uuritavate preparaatide asovärvide referentskoguseid ning analüüside käigus saadud tulemusi.

MÕISTED

ADI (*Accepted Daily Intake*) – näitab aine kogust, mida võib ööpäevas kogu eluea jooksul ohutult tarbida, arvestatuna kehakaalu kilogrammi kohta (Eesti toitumis... 2017).

Ekstinktsioonitegur – molaarne ekstinktsioonitegur näitab uuritava aine 1-molaarse lahuse absorptsiooni lainepikkusel λ , kui lahuse kihi paksus on 1 cm (Kreen jt 2010: 40).

Genotoksiline – hävitav toime raku geneetilisele materjalile (DNA, RNA), mis mõjutab selle terviklikkust (Shah 2012: 43).

Immunosupressioon – olukord, kus ravimite tarvitamise tõttu on immuunsüsteemi töö vähem efektiivne või hoopis peatatud. Enamasti rakendatakse seda juhul, kui on toimunud organi siirdamine. (Immunosuppression).

Kantserogeenne – võib põhjustada pahaloomuliste kasvajate teket või suurendada nende esinemissagedust (Töökeskkonna kantserogeenid 2012).

Kromatogramm – süsteemis toimunud ainete eraldamise esitamisviis. Kromatogrammile joonistuvatest piikidest esineb iga piik erinevat ainet. (How Does...).

LD₅₀ (*Median Lethal Dose*) – aine annus, mis surmab pool (50%) katseorganismidest. LD₅₀ väljendatakse tavaliselt aine massiühikuna isendi kehakaalu kilogrammi kohta (mg/kg kehakaalu kohta). (RaTeRa - Rahvatervishoiu...).

Monotsüüt – luuümbrises valmistatud teatud tüüpi valge verelible, mis liigub läbi vere organismi kudedesse, kus ta muundub makrofaagiks. Makrofaagid ümbritsevad ja hävitavad mikroorganisme, eemaldavad surnuid rakke ja suurendavad immuunvastuseid. (NCI Dictionary...).

Mõõtemääramatus – mõõte- või analüüsitulemusele omistatavate võimalike väärtuste hajusust iseloomustav parameeter. Iseloomustab mõõtetulemuste usaldusväärsust. (Leito ja Viitak 2007: 25).

Määramispiir – madalaim analüüdi sisaldus proovis, mida meetodika võimaldab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata (Leito ja Viitak 2007: 20).

Referentsväärtus – proovis analüüdi tegeliku sisalduse parim võimalik hinnang (Leito ja Viitak 2007: 73).

Retentsiooniaeg – aeg, mis kulub aine sisestamisest tema piigi maksimumi väljumiseni kromatogrammil (Parts).

Valideerimine – protsess, mille eesmärk on välja selgitada, kas meetodika vastab eesmärgile ehk kas ta kõlbab analüüsiks, milleks teda soovitakse kasutada (Leito ja Viitak 2007: 28)

1. ASOVÄRVIDE KEEMILINE LOOMUS JA TOIME ORGANISMIS

Looduslikke värvide ajalugu on pikk ning huvitav. Varaseim kirjalik dokument loodusliku värvaine kasutamise kohta pärineb Hiinast aastast 2600 eKr. Värvitööstuse algusaastatel toodeti värve looduslikust materjalist – taimedest ja putukatest. Loodusliku materjali suurimaks miinuseks oli piiratud värvivalik. Sünteetiliste värvainete tööstus sai alguse 1856. aastal kui William Henry Perkin's valmistas kivisöetõrvast lillaka värvi. Esimene asovärv aniliin kollane toodeti 1861. aastal. (Bafana jt 2011: 351).

Asovärvid on suurim rühm värvaineid, moodustades umbes 70% kõikidest maailmas toodetud orgaanilistest värvidest (Bafana jt 2011: 351). Need on keemiliselt tähistatud kui $R-N=N-R'$, kus $-N=N-$ tähistab asorühma ja R või R' võib olla kas arüül või alküülrühm. Ajalooliselt tuleb sõna “aso” prantsuse keelsest sõnast *azote*, mis tähendab lämmastikku ning mis on omakorda tuletatud kreeka keelsetest sõnadest: *a* (mitte) *zoe* (elada). (Chung 2016: 233). Need ühendid on väga stabiilsed valguse, hapniku ja pH muutuste suhtes (Gómez jt 2016: 808). Esimesed asovärvid saadi kivisöetõrvast, tänapäeval sünteesitakse neid kõrgelt puhastatud naftasaadustest (Amchova jt 2015: 914).

Enamus asovärve on vees lahustuvad mis tähendab, et need imenduvad organismis kergesti. Enamasti toimub imendumine läbi sissehingamise, alla neelamise või naha kaudu. (Azo dyes... 2018). Asovärvid muundatakse organismis aromaatsed amiinideks. Kõige märkimisväärsem biotransformatsioon toimub juhul, kui aromaatsed amiinid lagundatakse inimese soole mikroflooras asoreduktaasi abil. (Chung 2016: 238-239). Sünteetilisi värvaineid lisatakse toiduainetele ja jookidele, et parandada nende välimust ja tekstuuri, kuid neil ei ole toiteväärtust (Gómez jt 2016: 808).

1.1. Asovärvide toksikoloogia

Sünteetilised värvid on mitmete harude, näiteks tekstiili-, farmaatsia-, ja toidutööstuse aluseks. Asovärvid moodustavad 70% igapäevaselt toodetud värvidest. (Bafana jt 2011: 350). Suure tootlikkuse tõttu on värvide tootmine hakanud avaldama negatiivset mõju nii keskkonnale kui inimeste tervisele (Rawat jt 2016: 592). Mitmed sünteetilised värvid, eriti asovärvid, on mürgised ning mutageense toimega, seetõttu on need paljudes riikides keelatud. Asovärvide LD₅₀ Euroopa Liidu seadusandluse alusel on vahemikus 250–2000 mg/kg kohta. (Bafana jt 2011: 350-353). Euroopa Liidus on keelatud kasutada värvainet

Red 2G (E128), mis muundub organismis aniliiniks, mida loetakse kantserogeenseks aineks (Komisjoni määrus... 2007). “Seadusandlus riikide lõikes on erinev. Rootsis ning Leedus on keelatud toiduvärvide kasutamine lastele mõeldud toidus, Venemaal on lubatud kasutada nelja värvi. Eestis on lubatud kasutada kõiki Euroopa Liidus heaks kiidetud sünteetilisi värvaineid.” (Vihalemm).

On teada, et asovärvide lagunemisproduktid (näiteks aromaatsed amiinid) on mürgised ning kantserogeensed (Lipskikh jt 2016: 975). Mitmed asovärvid on resistentsed lagunemise suhtes, mistõttu on need toksilised inimeste ja loomade tervisele. Liigne tarbimine võib põhjustada tõsiseid terviseprobleeme, sealhulgas allergiat ja astmaatilisi reaktsioone, DNA kahjustusi, neerupuudulikkust ja hüperaktiivsuse häireid (ADHD). (Rovina jt 2016: 48). Laialdaselt on levinud uskumus, et toiduvärvid võivad tekitada toidutalumatust ning allergilisi reaktsioone, näiteks urtikaariat (Feketea ja Tsabouri 2017: 579).

2. ASOVÄRVIDE KASUTUSALAD

2.1. Farmaatsiatööstus

Farmaatsiatööstuse areng kiirenes peale Teist maailmasõda. Läbimurre saabus 19. sajandi lõpus, kui Paul Ehrlich sünteesis asovärvide baasil malaariavastase ravimi. Algaimeks oli aniliinvärv metüleensinine, mille derivaadid on samuti efektiivsed malaariavastased ühendid. Ehrlich üritas asovärvidega ravida ka aafrika trüpanosomiaasi, kuid põrus. (Wainwright 2008: 582-583). Aafrika trüpanosomiaasi ehk unetõve haigustekitaja on algloom *Trypanosoma brucei gambiense* või *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Haigust kannavad loomalt inimesele või haigelt inimeselt tervele üle tsetsekärbsed. Haigusnähtudeks on tsetsekärbse hammustuskohale tekkiv valulik sõlmeke, tõusev palavik, tugev peavalu ja unetus ning nahalööve. Lümfisõlmed suurenevad ja on valulikud. Haiguse hilises staadiumis kahjustub kesknärvisüsteem, tekivad koordinatsiooni-, taju- ja psüühikahäired ning unisus, tahtmatud liigutused ja südamekahjustus. Ravimata lõpeb haigus surmaga. (Aafrika trüpanosomiaas 2019).

Lähtudes Ehrlichi avastustest, hakkas Carl Browning 19. sajandil sõjahaavade ravimiseks kasutama akriidini derivaate proflaviini ning akriflaviini. Mõlemad ühendid on tugevad antiseptikumid mis nahaga kokkupuutel värvivad naha punaseks. On kindlaks tehtud, et aminoakriidiinid omavad toimet bakteri DNA-le ning inhibeerivad replikatsiooni. (Wainwright 2008: 584-585).

2.2. Toiduainetööstus

Toidu lisaaine on mistahes aine, mida tavaolukorras ei tarbita toiduna ega koostisosana, välja arvatud ained, mis lisatakse toidule, et säilitada või parendada toiteväärtust. Samuti lisatakse neid, et pidurdada rikkumist ja parandada struktuuri, välimust, koostist ja organoleptilisi omadusi. (Vihalemm). Euroopa Toiduohutusamet defineerib toiduvärve kui toidu lisaained, mille eesmärgiks on tagada värvi säilivus ka peale päikesevalguse ja niiskusega kokkupuudet. Lisaaineid klassifitseeruvad: säilitusained, emulgaatorid, antioksüdandid, stabilisaatorid, maitseained, magusained ning värvained. (Feketea ja Tsabouri 2017: 579). Tänapäeval lisatakse toiduvärve erinevatesse toodetesse, näiteks piimatoodetesse ning suupistetesse. Nende peamine eesmärk on muuta toit tarbija jaoks atraktiivsemaks. (Rovina jt 2016: 48). Toiduvärvid jagunevad looduslikeks ning

sünteesilisteks (Feketea ja Tsabouri 2017: 579-580). Looduslikke värve saadakse nii toiduainetest kui ka looduslikust materjalist, sünteetilised toodetakse keemiliste protsesside käigus (Amchova jt 2015: 914). Kõige sagedamini kasutatavad asovärvid toiduainetööstuses on alluurpunane, briljantsinine, tartrasiin ja päikeseloojangukollane (Feketea ja Tsabouri 2017: 582).

Lähtuvalt Euroopa Ühenduse määruse nr 1333/2008 kohaselt peab olema esitatud lisateave koos toiduvärvi nimetuse või E numbriga „võib avaldada kahjulikku mõju laste aktiivsusele ja tähelepanuvõimele“ järgnevatel asovärvidel: päikeseloojangukollane (E110), kinoliinkollane (E104), asorubiin (E122), tartrasiin (E102), võlupunane (E129), erkpunane 4R (E124) (Tarbijakaitseamet kontrollis... 2011).

2.3. Kosmeetikatööstus

Kosmeetikatoode on aine või segu, mis on välja töötatud naha, juuste, näo- ja ihukarvade, küünte, huulte ja väliste suguelundite või hammaste ja suuõõne limaskestade puhastamiseks, lõhnastamiseks ja kaitsmiseks. Kasutatakse ka välimuse muutmiseks ning hea seisukorra hoidmiseks. Kosmeetikatooted ei tohi olla inimese tervisele kahjulikud ning pakendid peavad olema nõuetekohaselt märgistatud. (Kosmeetikamäärusega sätestatud... 2017).

Kõige laialdasemalt on kosmeetikas kasutusel sünteetilised värvid. Asovärvide tähtsus ning kasutamise populaarsus tuleneb madalatest tootmiskuludest. Samuti on need võrreldes looduslike värvidega vastupidavamad valgusele, kuumusele ja pH taseme kõikumistele. Kosmeetikas kasutatavaid värvaineid saab rühmitada struktuuri, värvi ning lahustuvuse järgi. (Guerra jt 2018: 1-2). Lahustuvuse alusel jagunevad värvained tootes lahustuvateks ja mittelahustuvateks ühenditeks. Lahustuvad on värvid, mille alla kuuluvad ka asovärvid. Vees lahustuvad asovärvid on kõige tähtsamad tooni andvad ühendid kosmeetikatööstuses, mis toonivad enamasti ainult toodet, mitte inimese nahka. (Clark 2011: 182).

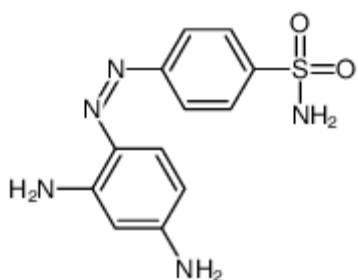
Kinoliinkollane on genotoksiline naha kaudu imendumisel. Asovärve kasutatakse püsimeigi ning tätoveeringute tegemisel. Kuna need värvid ei ole püsimeigi ega tätoveeringute tegemiseks loodud, on nende puhtusaste antud tegevuste jaoks madal. (Guerra jt 2018: 3).

3. ASOVÄRVIDE SEOS ANTIBAKTERIAALSETE AINETEGA

Enne antibiootikumide tarvitamisele võtmist 1930. aastal, kasutati värvaineid mikroskoopilistel uuringutel. Kuna bakterid absorbeerivad värvaineid, muutuvad nad värviga kokkupuutel nähtavaks. Lähtuvalt sellest hakkasid I.G. Farbeni teadlased otsima värvaineid, mida bakterid absorbeerivad kuid mis on nende jaoks mürgised. Värvainetega tehti *in vitro* ja *in vivo* katseid. *In vitro* korral viiakse katse läbi katseklaasis või Petri tassil, *in vivo* korral elusorganismidega. I.G. Farbeni teadlased leidsid, et mõningad värvained olid antibakteriaalsed *in vivo* kui ka *in vitro* katsetes. Värvaine Prontosil osutus inaktiivseks *in vitro* ning aktiivseks *in vivo*. (Carey ja Giuliano 2011: 966).

3.1. Prontosil

Esimest meditsiinis kasutatavat asovärvi punast Prontosili saadi kiviõetõrvast (vt joonis 1). Inglise keeles kutsutakse seda veel *sulfamidochrysoidine*, *rubiazol*, *aseptil rojo*, *streptocide*, ja *sulfamidochrysoidine hydrochloride*. I.G. Farbeni uurimisrühma liige Gerhard Domagk kasutas 1932. aastal Prontosili stafülokokiga eluohtlikult nakatunud lapse raviks. Ravi oli väga kiire ning laps paranes täielikult. Domagk patenteeris 1932. aastal Prontosili meditsiiniliseks kasutamiseks. (Chung 2016: 235). Uurimistöö eest Prontosilist pälvis Domagk 1939. aastal Nobeli meditsiini- ja füsioloogiapreemia. (Carey ja Giuliano 2011: 966).



Joonis 1. Prontosili struktuurvalem (Prontosil).

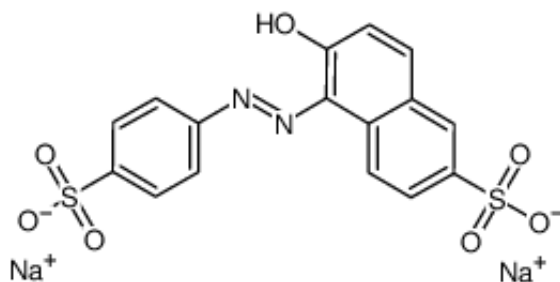
Prontosili antibakteriaalne toime *Streptococcus pyogenes* süsteemse infektsiooni vastu avastati 1932. aastal tehes katseid hiirtega. Domagki poolt läbiviidud eksperimendis süstiti 26le hiirele hemolüütilist streptokokki bakterikultuuri. Poolteist tundi hiljem süstiti nendest 12 hiirele doos Prontosili. Hiired, kellele manustati Prontosili jäid elama, ülejäänud 14

kontrollhiirt surid. Katsega tõestas Domagk, et Prontosil toimib streptokokkidele *in vivo*, kuid mitte *in vitro* ning ei ole hiirtele mingil määral toksiline. (Chung 2016: 235). Uurimused näitasid, et Prontosili antibakteriaalsed omadused ei ole seotud värvaine omadustega. Organismis toimub asosideme katkemine ning tekib sulfaniilamiid. (Carey ja Giuliano 2011: 966). Algselt levis arvamus, et antibakteriaalne toime on asovärvil, hiljem aga selgus, et toimet omab hoopis asovärvilise reduktsiooni produkt sulfaniilamiid (Wainwright 2008: 585). Kui Ameerikas võeti kasutusel sulfaniilamiinidel baseeruvad ravimid, vähenes kopsupõletikust põhjustatud surmade arv märgatavalt (Carey ja Giuliano 2011: 966). Samuti kasutati ravimeid veremürgituse ning gonorröa raviks (Chung 2016: 235).

Tänapäeval kasutatakse sulfoonamiide harva, peamiselt haiglates (Wainwright 2008: 586). Nüüdisajal on väga levinud trimetoprimi ning sulfametoksasooli kombinatsioon, mida kasutatakse kuseteede bakteriaalse infektsiooni, ägeda keskkõrvapõletiku ning kroonilise bronhiidi ägenemise korral. (Wainwright 2008: 586; Ravimiomaduste kokkuvõte: Berlocid... 2018). Kombinatsiooni kasutatakse ka sulfametoksasooli ja trimetoprimi suhtes tundlike mikroorganismide põhjustatud infektsioonide ravis, samuti kopsupõletiku ja toksoplasmoosi profülaktikaks ja raviks (Ravimiomaduste kokkuvõte: Berlocid... 2018). Toksoplasmoos on rakusisese alglooma *Toxoplasma gondii* tekitatud imetajate ja lindude tõbi. Inimesel kulgeb toksoplasmoos gripilaadselt. Rasedate esmanakatamisel haigestuvad tihti looted, esineb aborte ja lapsed võivad sündida hälvetega. Inimeste riskigruppide hulka kuuluvad rasedad, kes varem pole toksoplasmoosi põdenud ning immuunpuudulikkusega isikud. (Toksoplasmoos). Ravimi kasutamise ajal peab arst patsienti pidevalt jälgima neeru- või maksafunktsiooni kahjustuse, kilpnäärmefunktsiooni häirete ja foolhappe defitsiidi kahtluse korral, samuti juhul, kui tegemist on eaka patsiendiga (Ravimiomaduste kokkuvõte: Berlocid... 2018).

4. PÄIKESELOOJANGUKOLLANE FCF

Päikeseloojangukollane FCF (E110), keemilise nimetusega dinaatrium-2-hüdroksü-1-(4-sulfonatofenüülaso)-naftaleen-6-sulfonaat on asovärv mida kutsutakse ka õhtukollaseks või söödavaks kollaseks (Komisjoni direktiiv... 2006; Rovina jt 2016: 48; Gómez jt 2016: 807) (vt joonis 2). Päikeseloojangukollast kasutatakse laialdaselt toiduainetööstuses, ravimites ning kosmeetikatoodetes. Kasutamise eesmärgiks on anda tootele oranž või punane värvus. (Rovina jt 2016: 48). Päikeseloojangukollase tootmise käigus võib teatud tingimustes tekkida Sudan I (Komisjoni direktiiv... 2006). Sudan I on lipofiilne asovärv, mida kasutatakse laialdaselt tööstuslikel ja teaduslikel eesmärkidel, kuid mille kasutamine toiduvärvainena on keelatud selle kantserogeensuse tõttu (Gómez jt 2016: 808). Toidulisandites lubatud päikeseloojangukollase kogus on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta (Toidus lubatud... 2000).



Joonis 2. Päikeseloojangukollase keemiline struktuur (Sunset Yellow).

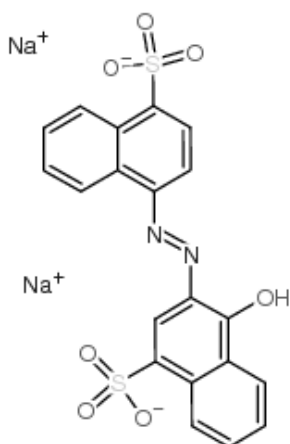
Üleliigsel tarbimisel võib päikeseloojangukollane põhjustada astmat, immunosupressiooni, ekseemi ning migreeni. Päikeseloojangukollast seostatakse samuti vähi tekkega. Toksilisus ning kantserogeensus imetaja organismile võib olla põhjustatud asovärvi vastastikusest toimest retseptor molekulide rakusiseses vedelikuga või läbi vabade radikaalide moodustamise. Mitte-tsütotoksiline doos päikeseloojangukollast võib omada immunomoduleerivat toimet. Asovärv vähendab harknäärme kaalu ning monotsüütide arvu. (Rovina jt 2016: 49). On kindlaks tehtud, et vastupanu infektsioonhaigustele sõltub peamiselt monotsüütide sekkumisest (Hashem jt 2010: 1584).

Värvainega teostati katse Rahvusvaheliste Uuringute Keskuses, Gizas, Egiptuses. Katse viidi läbi 50ne emase albiinorotiga, kes olid jagatud viide gruppi. Katse kestus oli neli nädalat ning selle aja jooksul jälgiti rottide kehakaalu muutust. Katse lõpus kaaluti ka põrn

ning harknääre. Tulemused näitasid, et manustades rottidele oralselt 315 mg/kg päikeseloojangukollast, ei muutu katsealuste kehakaal. Samuti ei muutunud rottide põrna kaal, kuid vähenes harknäärme kaal. Antud doos asovärvi ei mõjutanud rottide valgete vereliblede arvu, vähendas aga monotsüütide arvu. Katse kinnitab, et päikeseloojangukollane tekitab immunosupressiooni ning mõjutab monotsüütide arvu. Värvaine võib mõjutada immuunsüsteemi terviklikkust. (Hashem jt 2010: 1582-1584).

5. ASORUBIIN

Asorubiin (E122), keemilise nimetusega dinaatrium-4-hüdroksü-3-(4-sulfonato-1-naftüülase)-naftaleen-1-sulfonaat on sünteetiline punane värvaine, mis kuulub asovärvide hulka (vt joonis 3). Sünonüümideks on karmoisiin ning toidupunane 3. (Komisjoni rakendusmäärus... 2012); (König 2017: 40). Enamasti saadakse asorubiini dinaatriumsoolast. Kõige rohkem kasutatakse seda dekoratsioonides, kastmetes, lõhekala ja kalapasta värvimiseks. Samuti kasutatakse asorubiini nii alkoholsetele kui ka mittealkohoolsete jookidele värvi andmiseks. Alkoholsetes jookides võib asovärvi sisaldus olla kuni 200 mg/l ja mittealkohoolsetes jookides 50 mg/l. (König 2017: 40). Toidulisandites lubatud asorubiini kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta (Toidus lubatud... 2000). Asorubiini peamisteks kõrvaltoimeteks on toime maksale, veresuhkru tõus plasmas ja kaalutõus (Montaser jt 2013: 2194).

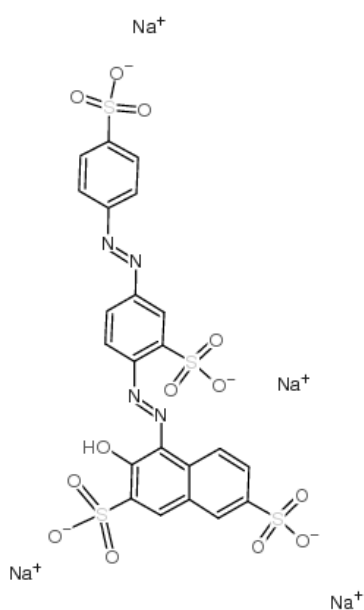


Joonis 3. Asorubiini keemiline struktuur (Acidic Red...).

Asorubiiniga viidi läbi katse Egiptuses, Kairos. Katses kasutati 36 noort albiino rott, kes kaalusid vahemikus 60-80 grammi. Loomadele manustati kahes annuses asorubiini – madalam annus oli 8-15 mg/kg ning kõrgem annus 100-500 mg/kg. Katse ajal jälgiti loomade toitumist ning neile anti regulaarselt vett. Katse lõpus võeti rottidelt vereanalüüs ning tulemused näitasid, et suured annused asorubiini tõstsid rottide kehakaalu. (Amin jt 2010: 2995).

6. ERKPUNANE 4R

Erkpunane 4R (E124), nimetatakse ka *Ponceau 4R*, *Cochineal Red A* ehk uuskošenill, keemilise nimetusega trinaatrium-2-hüdrosü-1-(4-sulfonato-1-naftüülaso)-naftaleen-6,8-disulfonaat on asovärv, mida kasutatakse laialdaselt alkohoolsetes ja mitte-alkohoolsetes jookides ning paljudes toidainetes, näiteks: juust, liha, kastmed, keeksipulbrid, keeksid, puu-ja juurviljakonservid ja karastusjoogid (vt joonis 4) (Abbey jt 2014: 460; Vihalemm; Komisjoni direktiiv... 1995). Toidulisandites lubatud erkpunase kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. (Toidus lubatud... 2000).

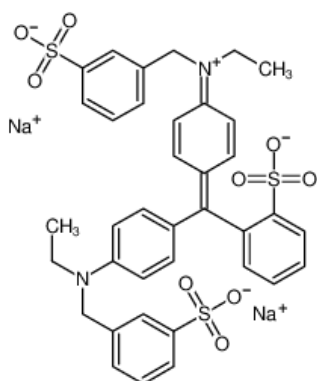


Joonis 4. Erkpunase keemiline struktuur (Ponceau S).

Peamine terviseprobleem erkpunase tarbimisega, on mõju laste käitumisele, peamiselt hüperaktiivsus. Ühendriikide Toiduohutusamet (*UKFSA*) tellis uuringu, kus uuriti kuute sünteetilist toiduvärvi, millest üks oli Ponceau 4R. Uuringu autorid väitsid, et on olemas seos laste hüperaktiivsuse ning sünteetiliste toiduvärvide vahel. Erkpunane ei ole kantserogeenne, genotoksiline, neurotoksiline ega põhjusta arengutoksilisust, kuid siiski võib luua seose erkpunase ning allergiliste reaktsioonide vahel. Jälgides lubatud päevaannuseid, ei kujuta Ponceau 4R inimtervisele otsest riski. (Abbey jt 2014: 460).

7. BRILJANTSININE FCF

Briljantsinine (E133) on asovärv, mis põhineb trifenüülmetaani struktuuril (Wang jt 2019: 126; EFSA 2013: 1) (vt joonis 5). Briljantsinist kasutatakse naariumsoolana, kuid on lubatud ka kaalium- ning kaltsiumsoolana. Briljantsinist toodetakse punakas-sinise värvusega graanulite või pulbrina ning on vees lahustuv (EFSA 2013: 6-8). Paljudes riikides, näiteks Austraalias, Hiinas, Uus-Meremaal, kasutatakse briljantsinist toiduvärvina. (Wang jt 2019: 126). Samuti on asovärv Euroopa Liidus heaks kiidetud. Euroopa Liidus on lubatud briljantsinise kogused toiduainetes vastavalt 20-500 mg/kg kohta ning jookides kuni 200 mg/l kohta. (EFSA 2013: 4). Briljantsinist tuleks käsitleda sissehingamisel ohuna. Kuna puuduvad andmed naha ning silmade ärrituse kohta, siis tuleks pidada briljantsinist potentsiaalselt ärritavaks nahale ja/või silmadele. Briljantsinist kasutatakse kasside ning koerte söödalisandites. FEEDAP tööühm peab kasside ning koerte jaoks briljantsinist ohutuks kuni kontsentratsioonideni 278 mg ja 334 mg/kg täissööda kohta. (EFSA 2013: 2). Toidulisandites lubatud briljantsinise kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. (Toidus lubatud... 2000).



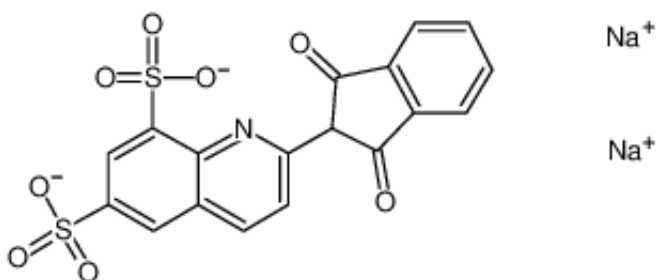
Joonis 5. Briljantsinise keemiline struktuur (Brilliant Blue...).

Briljantsinisega viidid läbi katse, kus katsealusteks olid *Beagle*’i koerad. Katses osales 7 isast koera ning 5 emast. Kõikidele manustati ühe aasta jooksul briljantsinist kontsentratsiooniga 1% või 2%. Neljale isasele ning kahele emasele koerale manustati 2% briljantsinist ning kahele isasele ning kahele emasele 1%. Mõlemist soost ühele koerale ei manustatud midagi ning neid hoiti kontrollgrupina. Koerte kehakaalu mõõdeti iga-nädalaselt. Üks 2% rühma isane koer suri infektsiooni tagajärjel. 1% rühmast suri isane koer avastamata infektsiooni tagajärjel, mis mõjutas looma pankreast ning maksa. Kaalumuutust ei tuvastatud kuna katsealuseid oli liiga vähe. (EFSA 2013: 9-10)

8. KINOLIINKOLLANE

Kinoliinkollane (E104) on kollane või rohekaskollane asovärv, mis kuulub disulfoonhappe derivaatide (dinaatriumsoolade) hulka (vt joonis 6). Seda turustatakse kaubanduses mono-, di- ja trisulfoonhappe derivaatide seguna. (E-ainete tabel; EFSA 2009: 7). Lahustub kergesti vees, halvemini etanoolis ning üldse mitte taimeõlides. Värv sisaldab enamasti monosulfonaatide, disulfonaatide ja trisulfonaatide ja täiendavate värvainete segu (naatriumkloriidi ja/või naatriumsulfaati). Kinoliinkollasel on inglise keeles vähemalt 28 erinevat sünonüümi, nagu näiteks *Acid Yellow*, *Food Color No. Yellow 13*, *INS No. 104* jne. (EFSA 2009: 7-8).

Sarnaselt briljantsinisele on ka kinoliinkollane Euroopa Liidus heaks kiidetud ning kasutusel. Kinoliinkollast võib toidus kasutada maksimaalselt annustes 50-500 mg/kg ja jookides 200 mg/l. (EFSA 2009: 7-9). Värv kasutatakse naha ja huulte kosmeetikatoodete valmistamisel ning lisaks karastusjookide ja maiustuste värvimisel. Kinoliinkollase peamised kõrvaltoimed on allergilised tursed ja nõgestõbi. (Chequer jt 2015: 54; Vihalemm). Samuti võib kinoliinkollane tekitada astmat, urtikaariat ja riniiti, kuid seda rohkem siis, kui seda tarbitakse koos teiste sünteetiliste värvainetega (EFSA 2009: 30). Toidulisandites lubatud kinoliinkollase kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. (Toidus lubatud... 2000).



Joonis 6. Kinoliinkollase keemiline struktuur (Quinoline yellow).

Prantsusmaal asuv *Laboratoire d'Etudes du Métabolisme des Médicaments* viis kinoliinkollasega läbi katse, kus kasutati emaseid ja isaseid rotte. Uuringu käigus mõõdeti rottide plasmas erinevate ajaintervallide tagant kinoliinkollasest põhjustatud radioaktiivsuse taset. Ajaintervallideks olid määratud 15 ja 30 minutit, 1, 2, 4, 8, 24 ja 48 tundi. Rottidele manustati suukaudselt 4 mg/l kinoliinkollast. Maksimaalne radioaktiivsuse tase plasmas saavutati 30 minutit kuni 1 tund pärast värvi manustamist ning enamik radioaktiivsest ainest seondus just plasmavalkudega. Tulemused näitasid, et väike osa

imendus seedetraktis, suurem osa nii maksas kui põies. Samuti leiti, et kontsentratsioon püsis kilpnäärmes kuni 48 tundi ja esimese 24 tunni jooksul leiti munasarjades kõrge kontsentratsioon radioaktiivset ainet. Isastel rottidel tuvastati kõrge kontsentratsioon kilpnäärmes. (EFSA 2009: 17).

9. UURIMISTÖÖ METOODIKA

9.1. Kirjanduse ülevaate metoodika

Lõputöö teoreetiline osa põhineb tõenduspõhise erialase kirjanduse ülevaatel. Kirjandusallikate leidmiseks kasutati Tallinna Tervishoiu Kõrgkooli raamatukogu, Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu ning otsingumootoreid *Google* ja *Google Scholar*. Kasutatud kirjanduse hulka kuuluvad raamatud, õpikud, tõenduspõhised teaduslikud artiklid ning elektroonilised allikad. Töö koostamisel kasutati Terviseameti ning Euroopa Liidu Teataja kodulehekülge. Elektroonilised teaduslikud artiklid on leitud andmebaasist *ScienceDirect*. Otsingusõnadena kasutati: asovärvid (*azo dyes*), päikeseloojangukollane (*sunset yellow*), ravimid (*drugs*), asorubiin (*azorubine*), karmoiisiin (*carmoisine*), erkpunane (*ponceau*), briljantsinine (*brilliant blue*), kinoliinkollane (*quinoline yellow*). *ScienceDirect*-ist leiti 26 kirjandusallikat, millest kasutati 17. Lõputöös kasutati usaldusväärseid kirjandusallikaid ning kasutatud artiklite ilmumisaastad jäid ajavahemikku 2008-2019. Kõik töös kasutatud mujalt allikatest pärinevad andmed on viidatud ja kajastatud kasutatud kirjanduse all. Lõputöö koostamisel ja vormistamisel kasutati juhendit „Kirjalike üliõpilastööde struktuur ja vormistamine Tallinna Tervishoiu Kõrgkoolis” (2017).

9.2. Valimi moodustamise metoodika

Uuringu esimeses faasis analüüsiti kolme asovärvi, milleks olid päikeseloojangukollane, asorubiin ja erkpunane. Teises faasis lisandusid briljantsinine ja kinoliinkollane. Vastavalt sellele telliti reaktiivide müügiga tegelevast firmast HNK Eesti referentsained puhtusega üle 95% või sellise puhtusastme puudumise korral nii suure puhtusega, kui võimalik. Referentsained on näidatud tabelis nr 1.

Tabel 1. Analüüsides kasutatud referentsained.

Asovärv	Lot nr	Säilivusaeg	Tootja
Erkpunane	A0390039	November 2022	ACROS Organics
Päikeseloojangukollane	MKCB3559	3 aastat alates avamisest	Aldrich
Asorubiin	10206226	Mai 2027	Alfa Aesar

Tabel 1 jätk

Asovärv	Lot nr	Säilivusaeg	Tootja
Briljantsinine	BCBV6154	3 aastat alates avamisest	Aldrich
Kinoliinkollane	153178	3 aastat alates avamisest	DR Ehrenstorfer

Uuringu esimeses faasis analüüsiti seitset apteegis müüdavat külmetusvastast käsimüügiravimit. Preparaatide valiku tegemisel lähtuti eelkõige lastele ja noortele suunatud külmetusvastastest ravimitest ning samuti sellest, kui mitmes leidis eelpool mainitud asovärve. Lastele suunatud külmetusvastased käsimüügiravimid valiti seetõttu, et asovärvide piirnormid on kehtestatud kehakaalu kohta. Lapsed võivad kaaluda sama palju kui täiskasvanud, kuid nende organism on palju vastuvõtlikum. Teises faasis lisandus seitse käsimüügiravimit. Ravimite valiku tegemisel lähtuti sobivusest lastele ning noortele ning lisaks võeti juurde preparaate, kus leidis analüüsitavaid asovärve. Täiskasvanutele mõeldud käsimüügiravimid valiti, kuna apteegis ostetakse neid tihti ning töö autorid peavad nendes asovärvide kasutamist ebavajalikuks.

9.3. Analüütilise uuringu meetodika

Lõputöö on koostatud empiirilise uuringuna, mis tugineb analüüside käigus kogutud andmete kvantitatiivsel analüüsil. Asovärvide kvantitatiivne analüüs viidi läbi Tallinna Tervishoiu Kõrgkooli instrumentaalanalüüsi laboris. Lõputöö meetodika väljatöötamist alustati meetodika: “*High Sensitivity UHPLC-DAD Analysis of Azo Dyes using the Agilent 1290 Infinity LC System and the 60 mm Max-Light High Sensitivity Flow Cell*” alusel. Meetodika alusel saadud katsetulemused ei olnud reprodutseeritavad. Seetõttu valiti lõputöö aluseks meetodika: “*Development and validation of an HPLC-UV method for determination of synthetic food colorants*”. Lõputöö meetodika valideeriti, et saada teada kui suur viga võib tekkida prooviettevalmistuse ning analüüsi käigus. Tänu valideerimisele saab realistlikumalt võrrelda analüüsis saadud tulemusi referentsväärtustega.

Analüüs teostati vedelikkromatograafiliselt UV/VIS-detektoriga, kasutades Agilent Technologies 1220 Infinity LC vedelikkromatograafi, koos gradient pumba ja kolonniga (4,6 x 250 mm). Esimeses faasis kasutati kahte lainepikkust: 520 nm ning 490 nm. Teises faasis lisandus briljantsinine lainepikkusega 600 nm ning kinoliinkollane lainepikkusega

430 nm. Katse teostamiseks valmistati kaks eluenti A ja B. Eluent A koosnes ammooniumatsetaadist. Eluendi valmistamiseks kasutati lahust kontsentratsiooniga 100 mMol. Eluent B koosnes atsetonitriilist. Mõlemad ained valati 1 l eluendipudelitesse ning ühendati HPLC pumpade süsteemiga.

9.4. Standardlahuste ettevalmistus

Standardlahuste valmistamiseks kaaluti 25,0 mg erkpunast, 26,0 mg asorubiini, 26,0 mg päikeseloojangukollast, 25,4 mg briljantsinist ning 25,0 mg kinoliinkollast. Pulbrid viidi 50 ml kolbidesse ning täideti metanooliga mahuni. Peale seda asetati asovärvide lahused lahustumise lihtsustamiseks 5 minutiks ultrahelivanni toatemperatuuril. Antud lahustest tehti omakorda lahjendused mida kasutati asovärvide lainepikkuste ning piikide määramiseks. Asovärvide kogused ning lahjendused on näidatud tabelis 2.

Tabel 2. Standardlahused ($\mu\text{g/l}$).

Asovärv	L4	L3	L2	L1
Päikeseloojangukollane	5,20	2,60	1,04	0,52
Erkpunane	5,00	2,50	1,00	0,50
Asorubiin	5,20	2,60	1,04	0,52
Briljantsinine	5,10	2,60	1,02	0,51
Kinoliinkollane	5,00	2,50	1,00	0,50

L5 valmistamiseks võeti päikeseloojangukollast 52,0 $\mu\text{g/l}$, erkpunast 50,0 $\mu\text{g/l}$, asorubiini 52,0 $\mu\text{g/l}$, briljantsinist 51,0 $\mu\text{g/l}$ ning kinoliinkollast 50,0 $\mu\text{g/l}$. Kalibreerimiskõvera koostamisel ei kasutatud L5, kuna kalibreerimisgraafikut analüüsides selgus, et see jäi kontsentratsiooni- ja lineaarsuspiirkonnast välja. L5 tehti 10 kordne lahjendus ning saadi L4, mille valmistamiseks mõõdeti 1 ml L5 lahust 10 ml kolbi ning täideti deioniseeritud (DI) veega märgini. L5 tehti 20 kordne lahjendus ning saadi L3, mille valmistamiseks mõõdeti 0,5 ml L5 lahust 10 ml kolbi ning täideti DI veega märgini. L5 tehti 50 kordne lahjendus ning saadi L2. L2 valmistamiseks mõõdeti 200 μg L5 lahust 10 ml kolbi ning kolb täideti märgini DI veega. L1, ehk L5 100 kordne lahjenduse tegemiseks mõõdeti 100 μg L5 10 ml kolbi ning täideti märgini DI veega. Standardlahused asetati kromatograafi autosamplerisse ning alustati analüüsi. Kõikide standardlahuste juures on arvesse võetud

lahuste puhtusastmeid, mis on järgmised: päikeseloojangukollane 96%, erkpunane 83%, kinoliinkollane 90,2%, asorubiin 98% ja briljantsinine 97%.

9.5. Lõputöös kasutatud ravimpreparaadid ning nende ettevalmistus analüüsiks

Uuringu esimeses faasis analüüsiti seitset ravimpreparaati – vees lahustuvat pulbrit (Fervex, Theraflu SN, Coldrex), siirupit (Sudafed Expectorant, Fluditec), suspensiooni (Panadol) ja losengi (Strepsils vitamin C) (vt tabel 3). Teises faasis analüüsiti lisaks eelmainitule veel seitset ravimpreparaati – vees lahustuvat pulbrit (Dolmen, TriFlunex), siirupit (Actifed), losengi (Septolete Omni mentool), kapslit (Espumisan, Loperamide-Grindeks) ja vaginaalset kapslit (Canesten) (vt tabel 4).

Tabel 3. Esimeses faasis analüüsitud ravimid.

Ravimi nimetus	Sisalduv asovärv	Vanusegrupp
Fervex 280+10+100 mg N8 suukaudse lahuse graanulid	päikeseloojangukollane (E110)	üle 6-aastased lapsed
Panadol suukaudne susp 120 mg/5 ml 100 ml	asorubiin (E122)	2 kuud - 12 aastat
Sudafed Expectorant siirup 6 mg+20 mg/ml 100 ml	päikeseloojangukollane (E110), erkpunane 4R (E124)	6-12 aastased
Fluditec sir 20 mg/ml 125 ml	päikeseloojangukollane (E110)	2-15 aastased
Strepsils vitamin C 100 mg 0,6 mg+1,2 mg+100 mg N24 loseng	päikeseloojangukollane (E110), erkpunane 4R (E124)	üle 6-aastased ja täiskasvanud
Theraflu SN, 500 mg/30 mg suukaudse lahuse pulber	päikeseloojangukollane (E110)	üle 15-aastased ja täiskasvanud
Coldrex Maxgrip Menthol & Berries, suukaudse lahuse pulber kotikeses 1000+10+70 g	päikeseloojangukollane (E110), asorubiin (E122)	üle 12-aastased ja täiskasvanud

Panadol on suukaudne suspensioon mida kasutatakse nõrga kuni mõõduka valu ja/või palaviku lühiajaliseks sümptomaatiliseks raviks. Ravimit kasutatakse maksimaalselt kolm päeva. Sisaldab asorubiini. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Panadol... 2018). Sudafed Expectorant siirupit kasutatakse nina limaskestast turse vähendamiseks nohu korral ja röga lahustamiseks ägeda produktiivse köha korral. Ravimit ei tohiks kasutada üle viie päeva.

Siirup sisaldab erkpunast ja päikeseloojangukollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Sudafed... 2018). Theraflu SN on näidustatud ülemiste hingamisteede viirusinfektsioonidest ja gripist põhjustatud sümptomite lühiajaliseks sümptomaatiliseks raviks. Ravimit tohib kasutada kuni kolm päeva. Sisaldab päikeseloojangukollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Theraflu... 2018) (vt joonis 8).



Joonis 8. Analüüsitud preparaadid.

Fervex on näidustatud palaviku alandamiseks, valu vaigistamiseks ning nohu sümptomaatiliseks raviks. Ravimit ei tohi kasutada üle 3 päeva. Sisaldab päikeseloojangukollast FCF. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Fervex... 2016). Fluditec siirupit kasutatakse lastel vanuses 2-15 aastat röga lahtistamiseks. Ravikuuri pikkuseks on tavaliselt 5 päeva. Sisaldab päikeseloojangukollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Fluditec... 2017). Strepsils on desinfitseeriv vahend, mida kasutatakse suu- ja neelupõletike korral patsientidel, kes samaaegselt vajavad täiendavalt C-vitamiini. Ravikuuri pikkuseks on kuni 3 päeva. Loseng sisaldab päikeseloojangukollast ning erkpunast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Strepsils... 2016). Coldrex'i kasutatakse lühiajalise palaviku alandamiseks, nõrga valu leevendamiseks ja nohu sümptomaatiliseks raviks. Ilma arsti soovituseta ei tohi kasutada kauem kui 7 päeva. Sisaldab päikeseloojangukollast ja asorubiini. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Coldrex... 2018) (vt joonis 8).

Tabel 4. Teises faasis analüüsitud ravimid.

Ravimi nimetus	Sisalduv asovärv	Vanusegrupp
Dolmen, 25 mg suukaudse lahuse graanulid	kinoliinkollane (E104)	täiskasvanud ning vanurid, lastel pole uuringuid
Actifed, siirup	kinoliinkollane (E104) päikeseloojangukollane FCF (E110)	täiskasvanud ja üle 12-aastased

Tabel 4 jätk.

Ravimi nimetus	Sisalduv asovärv	Vanusegrupp
TriFlunex, 500 mg/200 mg/10 mg suukaudse lahuse pulber	kinoliinkollane (E104)	täiskasvanud, eakad ja vähemalt 12-aastased
Espumisan, 40 mg pehmekapslid	kinoliinkollane (E104), päikeseloojangukollane FCF (E110)	alates 6-aastast
Septolete omni, 3 mg/1 mg losengid	briljantsinine FCF (E133)	alates 6-aastast
Loperamide-Grindeks, 2 mg kõvakapslid	kapslikeha: erkpunane 4R (E 124) kapslikaas: kinoliinkollane (E 104)	täiskasvanud ja üle 12-aastased
Canesten 500 mg vaginaalpehmekapsel	kinoliinkollane (E104), päikeseloojangukollane (E110)	täiskasvanud ja üle 12-aastased neiid

Dolmen on näidustatud nõrga kuni mõõduka tugevusega ägeda valu lühiajaliseks (maksimaalselt 3-4 päeva) sümptomaatiliseks raviks (ka lihas-skeleti valu, düsmenorröa ning hambavalu). Sisaldab asovärvidest kinoliinkollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Dolmen... 2018). Actifed siirupit kasutatakse nina limaskestasturset vähendamiseks nohu korral, sh allergilise nohu korral. Ravikuuri pikkuseks on määratud kuni 5 päeva. Sisaldab päikeseloojangukollast ja kinoliinkollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Actifed... 2019). Triflunex pulbrit kasutatakse ülemiste hingamisteede viirusinfektsioonide ja gripiga kaasneva nõrga kuni mõõduka valu, palaviku, ninakinnisuse lühiajaliseks levendamiseks (kuni 3 päeva) ja omab ka röga lahtistavat toimet. Värvainena sisaldab kinoliinkollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Triflunex... 2018). Espumisan kapsleid kasutatakse kõhupuhituse korral ja samuti ka täiendava vahendina seedetrakti diagnostiliste uuringute ettevalmistamiseks. Kapsleid võib kasutada pikema aja vältel. Espumisan sisaldab päikeseloojangukollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Espumisan... 2014). Septolete Omnit kasutatakse neelu-, suuõõne- ja igemepõletiku korral. Omab ka antiseptilist ja valuvaigistavat toimet. Ravikuur ei tohiks ületada 7 päeva. Asovärvidest sisaldab briljantsinist. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Septolete... 2018). Loperamide-Grindeks kapsleid kasutatakse kõhulahtisuse sümptomaatiliseks raviks maksimaalselt kaks päeva.

Asovärvidest sisaldab erkpunast ja kinoliinkollast. (Ravimiomaduste kokkuvõte: Loperamide... 2017) (vt joonis 9).



Joonis 9. Analüüsitud preparaadid.

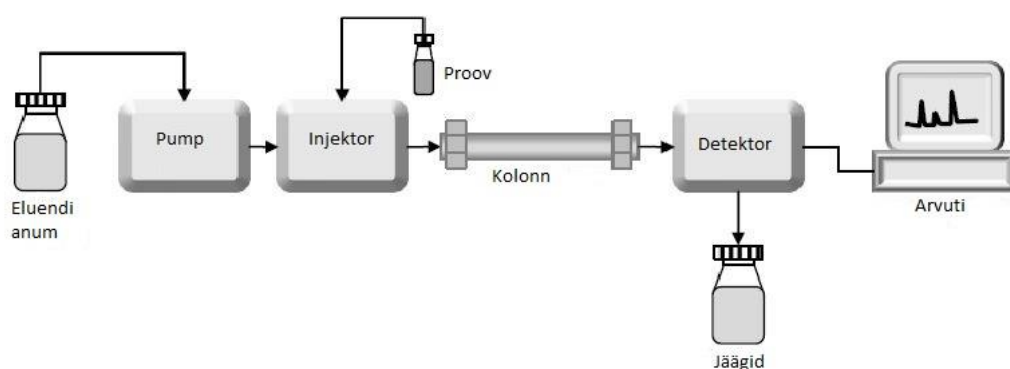
Uuritavate preparaatide analüüs algas proovide ettevalmistusega. Kõiki preparaate kaaluti 2,5 g ning viidi 25 ml kolbidesse ning täideti mahuni DI veega (Milli-Q veepuhastusseade). Strepsilsi ja Septolete Omni losengid purustati eelnevalt uhmis. Espumisani, Loperamide-Grindeksi ning Canesteni lahustamiseks tuli valmistada kuuma DI vett. DI keedetud vesi valati 25 ml kolbi ning ühte lisati Espumisani kapslid ning teise Loperamide-i kapslid. Kuna Canesteni vaginaalne kapsel oli 25 ml kolbi jaoks liiga suur, siis pidi seda lahustama keeduklaasis. Keeduklaasi mõõdeti 25 ml DI keedetud kuuma vett ning lisati Canesten. Proovi loksutati 3 minutit ning seejärel filtreeriti läbi puuvillavatist valmistatud filtri 25 ml-sse kolbi. Seejärel asetati kõik proovid ultrahelivanni 10 minutiks 45°C juurde. Meetodikat välja töötades kasutati algselt proovide lahjendamiseks atseetonitriili – 2,5 ml ainet viidi 25 ml kolbi ning täideti mahu märgini. Proovid asetati ultrahelivanni 5 minutiks toatemperatuurile. Selgus, et osad proovid ei lahustunud atseetonitriilis, moodustades sültja sademe. Seetõttu ei olnud proovid kasutuskõlblikud ning uuel katsel asendati atseetonitriil DI veega. Espumisani, Loperamide-Grindeksi ning Canesteni viaali viimiseks tuli lahused filtreerida läbi süstlafiltrite. Antud protseduur oli vajalik, kuna lahused sisaldasid sadet, mis oleks analüüsi tulemusi mõjutanud. Saadud lahused pipeteeriti 1,5 ml viaalidesse ning märgistati vastavalt. Viaalid asetati kromatograafi autosamplerisse ja alustati analüüsi.

9.6. Kõrgsurve-vedelikkromatograaf

Kromatograafia on meetod, mille puhul on võimalik lahutada ainete segud üksikuteks komponentideks. Kõrgsurve-vedelikkromatograafia (inglise k *High performance Liquid Chromatography*) ehk HPLC on vedelikkromatograafia täiustatud versioon, kus lahusti surutakse läbi kolonni väga suure survega, mis teeb selle meetodi kiireks. (High Performance... 2015).

HPLC koosneb järgmistest osadest (vt joonis 10):

- eluendi anum – sisaldab enamasti polaarsete ja mitte-polaarsete ainete segu, mille kontsentratsioon valitakse vastavalt proovi koostisele;
- pump – tekitab rõhu mobiilse faasi ja proovi viimiseks läbi kromatograafilise süsteemi;
- injektor ehk proovisisesti – võib olla ühekordne manuaalne süst või automatiseeritud süstimisüsteem;
- kolonn – terastoru, mis on täidetud silikageeli terakestega, mille pinnale on kaetud funktsionaalsed rühmad ja kus toimub segu komponentide eraldamine;
- detektor – tuvastab kolonnist väljuvad analüüdid;
- arvuti – genereerib analüütilise signaali alusel vastuse igale komponendile ning asetab need kromatograafi, mida on hiljem lihtne lugeda ja tõlgendada. (High Performance... 2015).



Joonis 10. Kõrgsurve-vedelikkromatograafia aparaat (High Performance... 2015, kohandatud).

HPLC süsteemis pumbatakse eluent ühtlase kiirusega kõrge rõhu all läbi kolonni. Seejärel sisestatakse analüüsiv proov dosaatorisse ning see liigub koos eluendiga kolonni.

Kolonnist väljudes tuvastab detektor väljuvad analüüdid ning saadab info arvutisse, mille alusel koostatakse kromatogramm. Analüüsitud proov väljub lõplikult detektorist koos eluendiga. (How Does...).

9.7. Andmete analüüsi metoodika

Kõrgsurve-vedelikkromatograaf näitab leitud asovärve piikidena, mis avalduvad erinevatel lainepikkustel. Asovärvi kogusest oleneb piigi pindala, mille avaldumist mõjutab retentsiooniaeg. Analüüsitud asovärvide retentsiooniajad on: päikeseloojangukollane 3,7 min, erkpunane 3,162 min, asorubiin 4,8 min, briljantsinine 5,19 min ning kinoliinkollane 5,325 min. Lõplike tulemuste arvutamiseks alustati prooviettevalmistusega, mis on täpsemalt ära toodud alapeatükis 9.5. Peale prooviettevalmistust viidi lahused viaalidesse ning analüüsiti vedelikkromatograafiliselt. Tulemuste arvutamisel võeti arvesse prooviettevalmistuse juures tehtud lahjendused (100 korda) ning proovi kaalutis. Arvutamise käigus arvestati ka kõikide standardlahuste puhtusastmeid, mis on järgmised: päikeseloojangukollane 96%, erkpunane 83%, kinoliinkollane 90,2%, asorubiin 98% ja briljantsinine 97%. Kõik tulemused esitati üksikannuste kohta.

10. TULEMUSED

Lõputöö esimeses faasis analüüsiti seitset apteegis müüdavat külmetusvastast preparaati. Vedelikromatograaf kalibreeriti kolme standardlahuse alusel. Kalibreerimisest jäeti välja kõige kangem standardlahus L5, mis sisaldas 51,0 µg/l päikeseloojangukollast, 52,8 µg/l erkpunast ning 53,0 µg/l asorubiini. Välja jätmise põhjuseks oli antud lahuse punktide paiknemine väljaspool lineaarsus-piirkonda. Antud töö võimaldas analüüsida ning määrata päikeseloojangukollase, erkpunase ja asorubiini esinemist ning koguseid külmetusravimites. Lisaks asovärvidele sisaldavad ravimid teisi lisaaineid ning toimeaineid, mida antud analüüsi käigus ei tuvastatud. Esimese faasi proovidega ei tehtud korduskatseid, seega tulemuste määramatus ei olnud teada. Kvantitatiivse uuringu tulemused on tabelis 5.

Tabel 5. Uuritavatest preparaatidest leitud asovärvi (asovärvide) kogus (kogused).

Ravim	Asovärv	Tulemus	Referentsväärtus	Erinevus ±20% referents väärtustest
Theraflu SN, 500 mg/30 mg suukaudse lahuse pulber (9,2 g ühes pakis)	päikeseloojangukollane	0,83 mg	0,6 mg	38%
Coldrex Maxgrip Menthol & Berries, suukaudse lahuse pulber kotikeses 1000+10+70 g (7,6 g ühes pakis)	päikeseloojangukollane	0,22 mg	andmed puuduvad	–
	asorubiin	3,10 mg	andmed puuduvad	–
Fervex 280+10+100 mg N8 suukaudse lahuse graanulid (2,9 g ühes pakis)	päikeseloojangukollane	0,02 mg	andmed puuduvad	–
Strepsils vitamin C 100 mg 0,6 mg+1,2 mg+100 mg N24 loseng (2,6 g üks loseng)	päikeseloojangukollane	0,21 mg	andmed puuduvad	–
	erkpunane	0,04 mg	andmed puuduvad	–

Tabel 5 jätk.

Ravim	Asovärv	Tulemus	Referentsväärtus	Erinevus $\pm 20\%$ referentsväärtustest
Fluditec sir 20 mg/ml 125 ml (5 ml)	päikeseloojangukollane	0,06 mg	andmed puuduvad	–
Panadol suukaudne susp 120 mg/5 ml 100 ml (5 ml)	asorubiin	0,03 mg	0,05 mg	40%
Sudafed Expectorant siirup 6 mg+20 mg/ml 100 ml (5 ml)	päikeseloojangukollane	0,24 mg	0,25 mg	4%
	erkpunane	0,27 mg	0,25 mg	8%

Referentsväärtused on teada SPC avaldatud kolme analüüsitud preparaadi kohta. Ülejäänute preparaatide referentsväärtused pole teada ja seetõttu lähtuti tulemuste võrdlemisel toidulisandite piirnormidest. Referentsväärtused on teada järgnevatel ravimitel:

- Theraflu SN, 500 mg/30 mg (9,2 g ühes pakis): Teadaolevat toimet omavad abiained: iga kotike sisaldab 0,6 mg päikeseloojangukollast (E110) (Ravimi omaduste kokkuvõte: Theraflu... 2018);
- Panadol, 120 mg /5 ml suukaudne suspensioon: Teadaolevat toimet omavad abiained: Iga 5 ml mõõtelusikatäis suspensiooni sisaldab 0,05 mg asorubiini (E122) (Ravimi omaduste kokkuvõte: Panadol... 2018);
- Sudafed Expectorant, 6 mg/20 mg/ml siirup: Teadaolevat toimet omavad abiained: 5 ml siirupit sisaldab 0,25 mg värvainet päikeseloojangukollane (E110), 0,25 mg värvainet erkpunane 4R (E124) (Ravimi omaduste kokkuvõte: Sudafed... 2018).

Theraflu SN pulbris määrati kvantitatiivseks koguseks 0,83 mg, mis ületas kehtestatud referentsväärtust. Tulemuse erinevus referentsväärtusest oli 38%. Panadoli kvantitatiivseks koguseks määrati 0,03 mg, mille tulemus on väiksem kui ravimi infolehes. Tulemus erineb referentsväärtusest 40%. Erkpunast sisaldav Sudafed Expectorant-i kogus ületas referentsväärtust. Erkpunase erinevus referentsväärtusest oli 8%. Kui arvestada lõputöö teises faasis saadud laiendatud mõõtemääramatusega, siis jäi erkpunase kogus

mõõtemääramatuse piiridesse. Päikeseloojangukollase kogus ravimis jäi lubatud hälbepiirkonda. Tulemuste ja referentsväärtuste erinevused võisid tuleneda meetodi määramatusest või määramatusest proovi ettevalmistamisel.

Kuna lõputöö esimeses faasis esines mõningane kõrvalekalle referentsväärtustest, otsustati teises faasis valideerimise käigus kindlaks teha meetodi laiendatud mõõtemääramatus, et anda hinnang preparaatide asovärvide sisalduse vastavusele referentsväärtustele. Selleks tehti analüüsi seeria kasutades preparaati Sudafed Expectorant. Sudafed Expectorant valiti, kuna ravimi referentsväärtused olid avaldatud SPC ning preparaat sisaldas kahte analüüsitud asovärvi. Valmistati viis proovi, iga proovi jaoks tehti eraldi prooviettevalmistus. Proovid valmistati ette vastavalt alapeatükile 9.5. Valideerimise käigus tehti kindlaks laiendatud mõõtemääramatus, milleks oli 35%. Tulemuste standardhälbe alusel anti hinnang korratavusele (vt tabel 6).

Tabel 6. Korduskatsed (K).

	Referents- väärtus	Kursusetöö tulemused	K 1	K 2	K 3	K 4	K 5	Keskmine
Päikeseloojangu -kollane	0,25 mg	0,24 mg	0,19 mg	0,22 mg	0,23 mg	0,23 mg	0,20 mg	0,22 mg
Erkpunane	0,25 mg	0,27 mg	0,22 mg	0,28 mg	0,29 mg	0,29 mg	0,25 mg	0,27 mg

Lõputöö teises faasis analüüsiti seitset apteegis müüdavat käsimüügiravimit. Vedelikchromatograaf kalibreeriti viie standardlahuse alusel. Kalibreerimisest jäeti välja kõige kangem standardlahus L5, mis sisaldas 52,0 µg/l päikeseloojangukollast, 50,0 µg/l erkpunast, 52,0 µg/l asorubiini, 51,0 µg/l briljantsinist ning 50,0 µg/l kinoliinkollast. Välja jätmise põhjuseks oli antud lahuse punktide paiknemine väljaspool lineaarsuspiirkonda. Esimese ning teise faasi standardlahuste asovärvide koguste erinevus tuleneb prooviettevalmistusest. Peamine erinevuse põhjus on kaalumise ebatäpsus. Antud töö võimaldas analüüsida ning määrata päikeseloojangukollase, erkpunase, asorubiini, kinoliinkollase ning briljantsinise esinemist ning koguseid ravimites. Kvantitatiivse uuringu tulemused on välja toodud tabelis 7.

Tabel 7. Uuritavatest preparaatidest leitud asovärvide kogused.

Ravim	Asovärv	Tulemus	Referentsväärtus	Erinevus ±20% referents väärtustest
Dolmen, 25 mg suukaudse lahuse graanulid (2,5 g ühes kotikeses)	kinoliinkollane	0,36 mg	1,2 mg	70%
Actifed 30 mg/1,25 mg/5 ml siirup (5 ml)	kinoliinkollane	0,30 mg	andmed puuduvad	–
	päikeseloojangukollane	0,004 mg	0,005 mg	20%
TriFlunex, 500 mg/200 mg/10 mg suukaudse lahuse pulber (4,36 g ühes pakis)	kinoliinkollane	0,33 mg	andmed puuduvad	–
Espumisan, 40 mg pehmekapsel (2 kapslit)	kinoliinkollane	0,53 mg	andmed puuduvad	–
	päikeseloojangukollane	0,004 mg	0,004 mg	0%
Septolete omni, 3 mg/1 mg losengid (2,5 g üks loseng)	briljantsinine	0,023 mg	andmed puuduvad	–
Loperamide-Grindeks, 2 mg kõvakapslid (2 kapslit)	erkpunane	0,089 mg	andmed puuduvad	–
	kinoliinkollane	ei tuvastatud	andmed puuduvad	–
Canesten 500 mg vaginaalpehmekapsel (1 vaginaalne kapsel)	kinoliinkollane	ei tuvastatud	andmed puuduvad	–
	päikeseloojangukollane	0,03 mg	andmed puuduvad	–

Referentsväärtused on teada SPC avaldatud kahe analüüsitud preparaadi kohta. Dolmeni referentsväärtus avaldati autoritele ravimifirma poolt. Ülejäänute preparaatide referentsväärtused pole teada ja seetõttu lähtuti tulemuste võrdlemisel toidulisandite piinormidest. Referentsväärtused on teada järgnevatel ravimitel:

- Actifed 30 mg/1,25 mg/5 ml siirup: Teadaolevat toimet omavad abiained: 5 ml Actifed siirupit sisaldab 0,005 mg päikeseloojangukollast (E110) (Ravimiomaduste kokkuvõte: Actifed... 2019);
- Espumisan, 40 mg pehmekapslid: Teadaolevat toimet omavad abiained: päikeseloojangukollane (E110) 0,002 mg/kapslis (Ravimiomaduste kokkuvõte: Espumisan... 2014);
- Dolmen, 25 mg suukaudse lahuse graanulid: Teadaolevat toimet omavad abiained: üks kotike sisaldab kinoliinkollast (E104) 1,2 mg (Teabenõue).

Actifedi siirupis määrati kvantitatiivseks koguseks 0,004 mis jääb alla kehtestatud referentsväärtuse. Ravimi erinevus referentsväärtusest oli 20%. Dolmeni kvantitatiivseks koguseks määrati 0,36 mg. Tulemus on 70% väiksem ravimifirma poolt saadud kogusest. Kuna Dolmeni referentsväärtus ei pärine Ravimiametilt vaid ravimifirmalt, siis ei ole kogus ametlikult kinnitatud. Espumisani analüüsil saadi päikeseloojangukollase koguseks üksikannuses 0,004 mg, mis ei erine kehtestatud referentsväärtusest. Lõputöö tulemused on arvutatud üksikannuste kohta.

Metoodika valideerimisega selgitati välja asovärvainete määramise metoodika laiendatud mõõtemääramatus, milleks oli 35%. Mõõtemääramatus arvuti kahe asovärvi kohta, mis mõlemad sisaldasid Sudafed Expectorant siirupis. Kahe asovärvi mõõtemääramatuse tulemused olid väga sarnased, seetõttu valiti neist suurem arvutatud määramatust ning see ümardati täisarvuni (35%). Kuna asovärvid on sarnaste omadustega, siis üldistati tulemus kõigile asovärvidele. Mõõtemääramatuse arvutamine võimaldab realistlikumalt võrrelda saadud tulemusi referentsväärtustega. Tulemused koos laiendatud mõõtemääramatusega ning referentsväärtustega on tabelis 8.

Tabel 8. Analüüsitud ravimite tulemused koos mõõtemääramatustega.

Ravim	Asovärv	Referentsväärtus	Tulemused	Mõõtemääramatus (U)
Theraflu SN, 500 mg/30 mg suukaudse lahuse pulber	päikeseloojangukollane	0,6 mg	0,83 mg	0,39–0,81 mg
Panadol suukaudne susp 120 mg/5 ml 100 ml	asorubiin	0,05 mg	0,03 mg	0,03–0,07 mg

Tabel 8 jätk.

Ravim	Asovärv	Referents- väärtus	Tulemused	Mõõtemääramatus (U)
Sudafed Expectorant siirup 6 mg+20 mg/ml 100 ml	päikeseloojangu- kollane	0,24 mg	0,25 mg	0,16–0,34 mg
	erkpunane	0,27 mg	0,25 mg	0,16–0,34 mg
Dolmen, 25 mg suukaudse lahuse graanulid	kinoliinkollane	1,2 mg	0,36 mg	0,78–1,62 mg
Actifed 30 mg/1,25 mg/5 ml siirup (5 ml)	päikeseloojangu- kollane	0,005 mg	0,004 mg	0,003–0,007 mg
Espumisan, 40 mg pehmekapsel	päikeseloojangu- kollane	0,004 mg	0,004 mg	0,003–0,005 mg

Mõõtemääramatuseid arvesse võttes saab väita, et Theraflu SN sisaldas päikeseloojangukollast üle lubatud piirnormi, milleks oli 0,6 mg, kuid analüüsidest saadi tulemuseks 0,83 mg. Dolmenis sisalduv kinoliinkollase kogus on väiksem võrreldes ravimifirmalt saadud info kohaselt. Tulemuseks saadi 0,36 mg kinoliinkollast ning referentsväärtuseks oli 1,2 mg. Kuna Dolmeni referentsväärtus ei pärine Ravimiametilt vaid ravimifirmalt, siis ei ole kogus ametlikult kinnitatud. Kuna erinevuseks on 70% ning andmed pole kinnitatud Ravimiameti poolt, vajab Dolmen pulber edasist uuringut, kus kontrollitakse üle referentsväärtuse usaldusväärsus ning tehakse korduskatseid, mis kinnitaksid tulemuste õigsust. Teised analüüsitud ravimid (Actifed, Panadol, Sudafed Expectorant ja Espumisan), mille referentsväärtused olid teada, vastavad SPC kajastatud kogustele ning mahuvad mõõtemääramatuse piiridesse.

11. ARUTELU

Asovärvid on tänapäeval väga sagedasti kasutatavad sünteetilised värvained. Neid kasutatakse, kuna tootmine on odav ning need muudavad toote tarbija jaoks atraktiivsemaks. Värvainete kasutusvaldkond on väga lai, alustades toiduainetest ning lõpetades ravimitega. Paljud asovärvid võivad tarbimisel tekitada negatiivset mõju, näiteks allergiat, astmat ning hüperaktiivsust. Hüperaktiivsus esineb enamasti lastel, seega antud töös analüüsiti enamasti ravimeid, mida võivad kasutada ka lapsed. Lõputöös uuriti lähemalt päikeseloojangukollast, asorubiini, erkpunast, briljantsinist ning kinoliinkollast.

Päikeseloojangukollane (E110) on oranži või punast värvi andev sünteetiline asovärv. Seda kasutatakse erinevates valdkondades, nagu farmaatsia-, toiduainete- kui ka kosmeetikatööstuses. Päikeseloojangukollase liigsel tarbimisel võivad tekkida järgmised kõrvaltoimed - astma, immunosupressioon, ekseem ning migreen. Samuti seostatakse seda vähi tekkega. Toidulisandites lubatud päikeseloojangukollase kogus on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. Asorubiin (E122) on punane asovärv, mida kasutatakse nii toiduainetööstuses, näiteks dekoratsioonides, kalatoodetes, alkoholsetes jookides kui ka farmaatsiatööstuses. Asorubiini peamisteks kõrvaltoimeteks on mõju maksale, veresuhkru tõus plasmas ning samuti kaalutõus. Toidulisandites lubatud asorubiini kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. Erkpunane 4R ehk uuskošenill on punane asovärv, mida kasutatakse peamiselt liha- ja juustutoodetes, lisaks maiustustes nagu keeksid, karastusjogid ning puu- ja juurviljakonservid. Peamine kõrvaltoime, mis seostub erkpunasega on laste hüperaktiivsus. Toidulisandites lubatud erkpunase kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. Briljantsinine (E133) on asovärv, mida kasutatakse toiduainetööstuses (nii inimestele mõeldud toidus kui ka loomasöötades), aga ka ravimites. Värv võib tekitada naha ning silmade ärritust ning seetõttu tuleks seda käsitleda ettevaatlikusega. Euroopa Liidus on toiduainetes lubatud koguseks 20-500 mg/kg briljantsinist ja jookides kuni 200 mg/l. Toidulisandites lubatud briljantsinise kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta. Kinoliinkollane (E104) on kollane või rohekaskollane sünteetiline värvaine, mida kasutatakse toiduainetööstuses ning kosmeetikatoodete ja ravimite värvimisel. Kõrvaltoimetena tekitab allergilisi turseid, nõgestõbi, astmat, urtikaariat ja riniiti. Toidus võib kasutada kinoliinkollast maksimaalselt 50-500 mg/kg ja

jookides 200 mg/l. Toidulisandites lubatud kinoliinkollase kogused on tahketes toodetes 300 mg/kg ning vedelikes 100 mg/kg kohta.

Paljud apteegis müüdavad ravimid ning toidulisandid sisaldavad asovärve. Toidulisandite puhul ei ole nõutud kliinilised katsed, mistõttu on kehtestatud üldine asovärvide päevane piirkogus. Ravimitel üldised piirnormid Eestis puuduvad, mistõttu on raske teha pistelisi uuringuid, et kontrollida sünteetiliste värvide sisaldust. Kuna toidulisandite piirnormid on kõrged, ei pidanud autorid vajalikuks hälvet arvutada, sest asovärvide kogused analüüsitud ravimites olid märgatavalt madalamad. Lõputöö valmimise ajal esitati Ravimiametile teabenõue asovärvide koguste kohta ravimites ja selle teabenõude ajendil lisati vastav info ravimite infolehtedesse.

Lõputöö eesmärgiks oli analüüsida Eestis apteegis müügil olevat 14 ravimpreparaati, mis sisaldasid asovärve. Ravimite valiku tegemisel lähtuti sobivusest lastele ning noortele ning lisaks võeti juurde ravimeid, kus leidus analüüsitavaid asovärve. Täiskasvanutele mõeldud ravimid valiti, kuna apteegis ostetakse neid tihti ning töö autorid peavad nendes asovärvide kasutamist ebavajalikuks. Lastele suunatud ravimid valiti, kuna laste organism on vastuvõtlikum kui täiskasvanute oma, samuti on asovärvide ekspositsioon kehakaalu ühe kilogrammi kohta tõenäoliselt mõnevõrra suurem Lõputöös analüüsitud preparaatidest leiti enamik otsitavatest asovärvidest ning määrati nende koguselised sisaldused. Preparaadid, mille referentsväärtused olid kajastatud SPC, sisaldasid osaliselt asovärvi/asovärve normi piires. Esimeses faasis analüüsitud ravimitest jäi laiendatud mõõtemääramatusest välja Theraflu SN, mille erinevus referentsväärtusest oli 38%. Mõõtemääramatust arvesse võttes mahtus Sudafed Expectorant piirnormidesse. Kui autorid ei arvestaks mõõtemääramatusega, siis saaks väita, et Sudafed Expectorant sisaldab erkpunast 8% rohkem, kui SPC märgitud. Panadol siirup sisaldas asorubiini 40% vähem SPC olevast referentsväärtusest. Teises faasis analüüsitud preparaatidest sisaldas Actifed siirup päikeseloojangukollast laiendatud mõõtemääramatuse piirides. Acrifed siirup sisaldas asovärvi 20% vähem SPC olevast referentsväärtusest. Samuti jäi Dolmenis sisalduv kinoliinkollase kogus mõõtemääramatuse piiridesse. Kuna Dolmeni referentsväärtus ei pärine Ravimiametilt vaid ravimfirmalt, siis ei ole kogus ametlikult kinnitatud. Kuna erinevuseks on 70% ning andmed pole kinnitatud Ravimiameti poolt, vajab Dolmen pulber edasist uuringut, kus kontrollitakse üle referentsväärtuse usaldusväärsus ning tehakse korduskatseid, mis kinnitaksid tulemuste õigsust. Espumisani veaprotsendiks tuli 0%. Ülejäänud 12 preparaadi võrdlusmoment püstitati toidulisandites lubatud koguste alusel.

Preparaatides kasutatud asovärvide sisaldused jäi toidulisandites lubatud koguste piiridesse.

Mõningates ravimites, näiteks Actifed siirup ning Canesten, ei suudetud määrata asovärvi sisaldust. Selle põhjuseks võis olla kinoliinkollase määramiseks liiga kõrge määramispiir või ebatäpsus prooviettevalmistusel. Canesteni puhul võis kinoliinkollane absorbeeruda prooviettevalmistuse käigus filtrile ning seetõttu võis saagis jääda liiga madalaks. Edasiste analüüside läbiviimiseks tuleks üle vaadata halvasti lahustuvate preparaatide prooviettevalmistus. Selline muutus võib aidata kaasa preparaatides sisalduvate asovärvide paremale tuvastamisele.

Eestis on asovärve vähesel määral uuritud. Analüüsidest välismaist kirjandust ning asovärvidega tehtud katseid, said lõputöö autorid töö kirjutamise käigus palju uut ning usaldusväärset infot. Autorid leidsid infot paljudest kõrvaltoimetest, mida asovärvid võivad tekitada, ning seetõttu ei poolda autorid asovärvide kasutamist. Autorid on arvamusel, et imikute ning laste jaoks ei ole määrav ravimi värv. Näiteks võib tuua analüüsitud Panadoli suukaudse suspensiooni, mida võib kasutada alates teisest elukuust. Panadol sisaldab asorubiini ning on punakas-roosa värvusega. Asovärvide mittekasutamine oleks laste ning täiskasvanute tervisele ohutum. Kuna antud ravimeid võivad kasutada ka täiskasvanud, siis on autorid arvamusel, et täiskasvanute jaoks ei oma ravimi värv samuti olulist tähtsust. Tänapäeval tarbivad inimesed üha rohkem toiduaineid, mis sisaldavad sünteetilisi lisaaineid, k.a asovärve. Lisaainete tarbimine võib kaasa tuua immuunsuse languse, mis omakorda suurendab haigestumise riski. Haigussümptomite leevendamiseks pöörduvad inimesed apteeki ning suure tõenäosusega ostavad sealt ravimi, mis võib sisaldada asovärvi. Autorite arvates tuleks suurendada inimeste teadlikkust sünteetiliste ainete osas, mis viiks tarbijad läbimõeldud valikuteni. Kõiki sünteetilisi värvaineid on võimalik asendada sama värvi looduslike värvidega, kui tootja peab vajalikuks toodet värvida. Punast tooni saab asendada näiteks peedimahlaga, kollast kurkumi ekstraktiga ning sinist segades kollast ja rohelist (klorofüllü ekstrakt).

JÄRELDUSED

Kirjandusest leitud informatsiooni ja kvantitatiivse uuringu tulemuste põhjal tehti järgmised järeldused:

- asovärvide lagunemisproduktid, näiteks aromaatsed amiinid on mürgised, seetõttu üleliigne asovärvide tarbimine võib osutada nii inimestele kui loomadele ohtlikuks. Üleliigne tarbimine võib põhjustada allergiat, astmaatilisi reaktsioone, DNA ja siseelundite kahjustusi ning lastel hüperaktiivsust;
- asovärve kasutatakse nii kosmeetika-, toiduaine-, kui ka farmaatsiatööstuses eesmärgiga tuua esile või säilitada toote esialgne värv;
- 1932. aastal avastatud esimene asovärvaine Prontosili antibakteriaalne toime ei tulene mitte asovärvist endast, vaid tema redutseerimise tagajärjel tekkivast produktist sulfaniilamiidist. Lähtuvalt sellest tehti järeldus, et asovärvidel puudub seos meditsiiniga, kuna need ei oma farmakoloogilist toimet. Asovärvid on ravimites kasutusel eesmärgiga anda tootele värv;
- analüüsides ravimite infolehti, osutusid enim kasutatavateks asovärvideks päikeseloojangukollane, asorubiin, erkpunane, kinoliinkollane ja briljantsinine;
- analüüsiti 14 Eesti apteekides müügil olevat käsimüügiravimit, mille valikul lähtuti eelkõige sellest, et need sobiksid lastele ja noortele ning sisaldaks analüüsitud asovärvi/asovärve;
- meetodika valideerimisel määrati laiendatud mõõtemääramatuseks 35%;
- lõputöö käigus analüüsitud asovärvide tulemused ei jäänud osaliselt lubatud hälbevahemikku, milleks on 20%.

Enamik analüüsitud preparaatidest jäid laiendatud mõõtemääramatusesse. Mõõtemääramatusest jäi välja Theraflu SN. Sellest lähtuvalt saab järeldada, et lõputöö tulemused ei toetanud osaliselt hüpoteesi, et apteegis müüdavates käsimüügiravimites on asovärve lubatud normi piires.

Kuna asovärvid on Eestis vähe uuritud teema ning aktuaalsus on suhteliselt madal, siis ettepanekuna saaks antud tööd jätkata uurides töö käigus väljatöötatud meetodika alusel ka teisi apteegis müüdavaid tooteid, mis sisaldavad asovärve.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abbey, J., Fields, B., O'Mullane, M., Tomaska, L.D. (2014). Food Additives: Colorants. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 459-465.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786128002250> (10.12.2018).

Aafrika trüpanosomiaas. (2019). Terviseamet.

<https://www.terviseamet.ee/et/nakkushaigused-a-u/aafrika-trupanosomiaas> (13.05.2019).

Acidic Red B. Molbase.

<http://www.molbase.com/en/cas-3567-69-9.html> (31.10.2018).

Amin, K. A., Hameid, H. A., Abd Elsttar, A. H. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510004977> (27.12.2018).

Amchova, P., Kotolova, H., Ruda-Kudcerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914-922.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230015300751> (11.09.2018).

Azo dyes. (2018). Swedish Chemical Agency.

<https://www.kemi.se/en/prio-start/chemicals-in-practical-use/substance-groups/azo-dyes#accept> (25.09.2018).

Bafana, A., Devi, S. S., Chakrabarti, T. (2011). Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews*, 19(NA), 350–371.

<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/a11-018#.W6pBgmzbiU> (25.09.2018).

Basu, A., Kumar, G. S. (2015). Binding of carmoisine, a food colorant, with hemoglobin: Spectroscopic and calorimetric studies. *Food Research International*, 72, 54-61.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915001106> (11.12.2018).

Brilliant Blue FCF. Molbase.

<http://www.molbase.com/cas/3844-45-9.html> (06.04.2019).

Carey, F.A., Giuliano, R.M. (2011). Orgaaniline keemia. New York: McGraw Hill.

Chequer, F.M.D., Venâncio, V.de.P., de Souza Prado, M.R., Campos da Silva e Cunha Junior, L.R., Lizier, T.M., Zanoni, M.V.B., Rodríguez Burbano, R., Bianchi, M.L. P., Antunes, L.M.G. (2015). The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777, 54-61.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571814002939> (06.04.2019).

Chung, K. T. (2016). Azo Dyes and Human Health: A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(4), 233–261.

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590501.2016.1236602?journalCode=lesc20> (25.09.2018).

Clark, M. (2011). Handbook of Textile and Industrial Dyeing. Cambridge: Woodhead Publishing.

<https://www.sciencedirect.com/book/9781845696962/handbook-of-textile-and-industrial-dyeing> (11.09.2018).

Corradini, M. G. (2019). Synthetic Food Colors. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 291-296.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965216065> (10.12.2018).

E-ainete tabel.

<http://www.acode.ee/dieet/e-ained.pdf> (06.04.2019).

Eesti toitumis- ja liikumissoovitused. (2017). Tervise Arengu Instituut.

https://intra.tai.ee/images/prints/documents/149019033869_eesti%20toitumis-%20ja%20liikumissoovitused.pdf?fbclid=IwAR228ZkUCkt_fccj4YNkkDn9qEKcZVNXLJKQI79RC5XMXmJxybMefRmvutY (27.12.2018).

EFSA. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Quinoline Yellow (E104) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1-40.

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1329> (06.04.2019).

EFSA. (2013). Scientific opinion on the safety and efficacy of Brilliant Blue FCF (E133) as a feed additive for cats and dogs. *EFSA Journal*, 11(7), 1-14.

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3288> (04.04.2019).

Erkurt, H. A. (2010). Biodegradation of Azo Dyes. Berlin: Springer.

Feketea, G., Tsabouri, S. (2017). Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? *Food Chemistry*, 230, 578-588.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461730420X> (04.10.2018).

Gómez, M., Arancibia, V., Aliaga, M., Núñez, C., Rojas-Romo, C. (2016). Determination of Sudan I in drinks containing Sunset yellow by adsorptive stripping voltammetry. *Food Chemistry*, 212, 807-813.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461630872X> (11.12.2018).

Guerra, E., Llompарт, M., Garcia-Jares, C. (2018). Analysis of Dyes in Cosmetics: Challenges and Recent Developments. *Cosmetics*, 5(3), 47, 1–15.

<https://www.mdpi.com/2079-9284/5/3/47> (11.12.2018).

Hashem, M. M., Atta, A. H., Arbid, M. S., Nada, S. A., Asaad, G. F. (2010). Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1581-1586.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510001778> (30.10.2018).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. (2015). Laboratory Info.

<https://laboratoryinfo.com/hplc/> (08.12.2018).

How Does High Performance Liquid Chromatography Work? Waters.
http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=en_US&cid=10049055 (08.12.2018).

Immunosuppression. Cambridge Dictionary.
<https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/immunosuppression> (13.12.2018).

KOMISJONI RAKENDUSMÄÄRUS (EL) nr 868/2012. (2012). Euroopa Liidu Teataja.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0868>
(22.10.2018).

KOMISJONI DIREKTIIV 2006/33/EÜ. (2006). Euroopa Liidu Teataja.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A32006L0033>
(22.10.2018).

KOMISJONI DIREKTIIV 95/45/EÜ. (1995). Euroopa Liidu Teataja.
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?uri=CELEX%3A01995L0045-20040510> (10.12.2018).

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 884/2007. (2007). Euroopa Liidu Teataja.
<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:195:0008:0009:ET:PDF>
(19.12.2018).

Kosmeetikamäärusega sätestatud nõuded. (2017). Terviseamet.
<http://www.terviseamet.ee/kemikaaliohutus/toodete-ohutus/kosmeetika.html> (27.09.2018).

Kreen, M., Robal, T., Randla, T. (2010). Biokeemia. Laboratoorsed tööd. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool.
http://ttu.ee/public/m/matemaatikaloodusteaduskond/Instituudid/keemiainstituut/Bioorgaanilise-keemia-oppetool/biokeemia/praktikum/BK_praktikum.pdf (11.10.2018).

König, J. (2015). Food colour additives of synthetic origin. *Colour Additives for Foods and Beverages*, 36-60.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782420118000027> (31.10.2018).

Leito, I., Viitak, A. (2007). Kvaliteeditagamine analüütilises keemias. Tallinn: TTÜ Kirjastus.

Leo, L., Loong, C., Ho, X.L., Raman, M.F.B., Suan, M.Y.T., Loke, W.M. (2017). Occurrence of azo food dyes and their effects on cellular inflammatory responses. *Nutrition*, 46(2018), 36-40.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900717301922> (30.10.2018).

Lipskikh, O.I., Korotkova, E.I., Khristunova, Ye.P., Berek, J., Kratochvil, B. (2016). Sensors for voltammetric determination of food azo dyes - A critical review. *Electrochimica Acta*, 260, 974-985.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468617325872> (12.12.2018).

Lucova, M., Hojerova, J., Pažourekova, S., Klimova, Z. (2013). Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 19-27.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512007727> (24.04.2019).

Montaser, M.M, Alkafafi, M.E. (2013). Effects of Synthetic Food Color (Carmoisine) on Expression of Some Fuel Metabolism Genes in Liver of Male Albino Rats. *Life Science Journal*. 10(2), 2191-2198.
https://www.researchgate.net/publication/256195960_Effects_of_Synthetic_Food_Color_Carmoisine_on_Expression_of_Some_Fuel_Metabolism_Genes_in_Liver_of_Male_Albin_o_Rats (27.12.2018).

NCI Dictionary of Cancer Terms: monocyte. National Cancer Institute.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/monocyte> (02.11.2018).

Parts, L. Õpiobjekt kromatograafia: Kromatograafia.
<http://avalik.ttk.ee/laine/kromatograafia/kromatograafia.html> (26.05.2019).

Prontosil. Molbase.
<http://www.molbase.com/en/103-12-8-moldata-1602881.html> (31.10.2018).

Ponceau S. Molbase.
<http://www.molbase.com/en/cas-6226-79-5.html> (31.10.2018).

Quinoline Yellow. Molbase.
<http://www.molbase.com/cas/8004-92-0.html> 06.04.2019.

RaTeRa - Rahvatervishoiu raamatukogu. Tartu Ülikooli tervishoiu instituut.
<http://rahvatervis.ut.ee/terms/terminid.php?id=379> (27.12.2018).

Ravimiomaduste kokkuvõte: Actifed 30 mg/1,25 mg/5 ml siirup (2019). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1004173.pdf (25.04.2019).

Ravimiomaduste kokkuvõte: Berlocid, 800 mg / 160 mg tabletid (2018). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1016086.pdf (27.12.2018).

Ravimiomaduste kokkuvõte: Coldrex Maxgrip Menthol & Berries 000 mg/70 mg/10 mg, suukaudse lahuse pulber kotikeses (2018). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1500747.pdf (18.12.2018).

Ravimiomaduste kokkuvõte: Dolmen, 25 mg suukaudse lahuse graanulid (2018). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1488135.pdf (25.04.2019).

Ravimiomaduste kokkuvõte: Espumisan, 40 mg pehmekapslid (2014). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1017515.pdf (25.04.2019).

Ravimiomadust kokkuvõte: Fervex, suukaudse lahuse graanulid (lastele) (2016). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1076464.pdf (18.12.2018).

- Ravimiomaduste kokkuvõte: Fluditec 20 mg/ml siirup (2017). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1022522.pdf (18.12.2018).
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Loperamide-Grindeks, 2 mg kõvakapslid (2017). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1007435.pdf (25.04.2019)
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Panadol 120 mg/5 ml suukaudne suspensioon (2018). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1009145.pdf (13.12.2018).
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Septolete omni, 3 mg/1 mg losengid (2018). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1648852.pdf (25.04.2019)
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Strepsils Vitamin C, losengid (2016). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1013117.pdf (18.12.2018).
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Sudafed Expectorant, 6 mg/20 mg/ml siirup (2018). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1015513.pdf (13.12.2018).
- Ravimiomaduste kokkuvõte: Theraflu SN, 500 mg/30 mg, suukaudse lahuse pulber (2018). Ravimiamet.
http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1595123.pdf (13.12.2018).
- Ravimiomaduste kokkuvõte: TriFlunex, 500 mg/200 mg/10 mg suukaudse lahuse pulber (2018). Ravimiamet.
https://www.ravimiregister.ee/Data/SPC/SPC_1639515.pdf (25.04.2019)
- Rawat, D., Mishra, V., & Sharma, R.S.** (2016). Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. *Chemosphere*, 155, 591–605.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516305422> (24.05.2019)
- Rovina, K., Prabakaran, P.P., Siddiquee, S., Shaarani S.M.** (2016). Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85(Part B), 47-56.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993615302326> (22.10.2018).
- Shah, S.U.** (2012). Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals. *Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals*, 1(2), 43-54.
<https://pdfs.semanticscholar.org/48e3/11b8e478b646df1d7254e50918f43e15f667.pdf> (27.12.2018).
- Sunset Yellow. Molbase.
<http://www.molbase.com/en/cas-2783-94-0.html> (31.10.2018).
- Teabenõue. (2019). Berlin-Chemie. (09.05.2019)
- Vihalemm, T.** E-ained meie igapäevaelus.

http://www.toitumisterapeudid.ee/failid/File/konverentsid/e_ained/Tiiu%2026_02_11.pdf (19.12.2018).

Tarbijakaitseamet kontrollis asovärve sisaldavate toidukaupade märgistust: rikkumisi tuvastati 22%. (2011). Tarbijakaitseamet.
<https://www.tarbijakaitseamet.ee/et/node/2856> (08.10.2018).

Toksoplasmoos. Veterinaar- ja Toiduamet.
<https://vet.agri.ee/?op=body&id=1201> (27.12.2018).

Toidus lubatud lisaainete loetelu ja piinormid toidugruppide kaupa, lisaainete kasutamise tingimused ja viisid ning lisaainete märgistamise ja muul viisil teabe edastamise erinõuded ja kord (RT, 2000, 81; 31.03.2000).
<https://www.riigiteataja.ee/akt/905492> (30.11.2018).

Töökeskkonna kantserogeenid. (2012). Tervise Arengu Instituut.
https://intra.tai.ee/images/prints/documents/135488464670_Tookeskkonna_kantserogeenid.pdf (27.12.2018).

Wainwright, M. (2008). Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes and Pigments*, 76(3), 582–589.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143720807000265> (11.09.2018).

Wang, H.L., Ding, H., Cao, P., Zhang, J.B., Wu, D., Tian, J. (2019). Theoretical Risk Assessment of Dietary Exposure to Brilliant Blue FCF in Chinese Population. *Biomedical and Environmental Sciences*, 32 (2), 126-129.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0895398819300789> (04.04.2019)