

# Određivanje vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

---

Hren, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:308734>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Barbara Hren**

**Određivanje vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Suzane Inić.

*Iskrene zahvale mojoj mentorici, doc.dr.sc. Suzani Inić, na strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na potpori u izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i sestri na financijskoj i psihičkoj podršci tijekom ovih godina studiranja.*

## SADRŽAJ

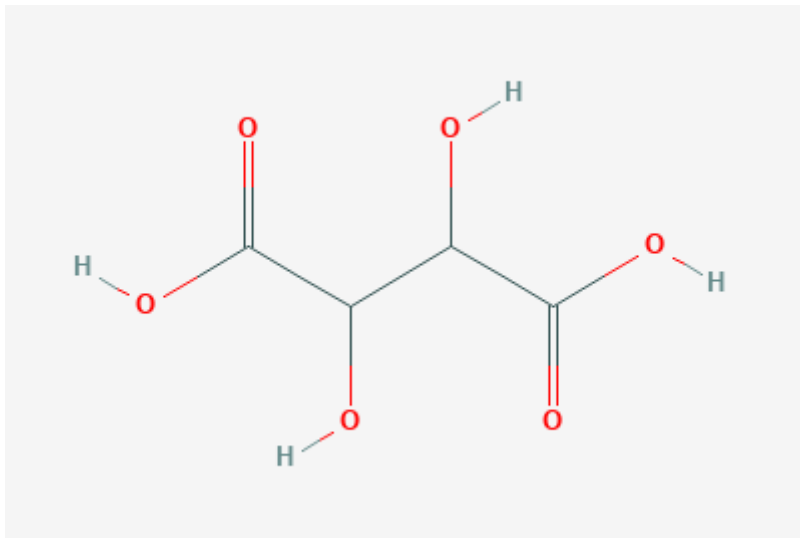
1. UVOD.....	1
1.1. Vinska kiselina.....	2
1.1.1. Primjena vinske kiseline.....	3
1.1.2. Vinska kiselina i ljudsko zdravlje.....	4
1.2. Kromatografske metode odjeljivanja.....	4
1.2.1. Podjela kromatografskih metoda.....	4
1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	5
1.2.3. Shematski opis HPLC instrumenta.....	6
1.3. Validacija metode.....	9
1.3.1. Preciznost.....	9
1.3.2. Specifičnost/selektivnost.....	10
1.3.3. Linearnost.....	10
1.3.4. Radno područje.....	10
1.3.5. Točnost.....	10
1.3.6. Granica dokazivanja.....	11
1.3.7. Granica određivanja.....	11
1.3.8. Izdržljivost.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Kemikalije.....	16
3.1.1. Korištene kemikalije.....	16
3.2. Aparatura.....	16
3.2.1. Korištena aparatura.....	16
3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a.....	16
3.2.3. Uvjeti na HPLC-u.....	16
3.3. Uzorci.....	17
3.4. Određivanje koncentracije vinske kiseline HPLC-om.....	17
3.4.1. Priprema otopina.....	17
3.4.2. Priprema uzoraka.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22

4.1. Određivanje vinske kiseline primjenom HPLC-a s UV/Vis detektorom .....	23
4.2. Validacija metode određivanja vinske kiseline HPLC-om s UV/Vis detektorom.....	25
4.2.1. Linearnost.....	25
4.2.2. Preciznost.....	26
4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja.....	29
4.3. Primjena validirane HPLC metode s UV/Vis detektorom za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima.....	29
5. ZAKLJUČCI.....	34
6. LITERATURA.....	36
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	39
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD..	42

## **1. UVOD**

## 1.1. Vinska kiselina

Vinska kiselina je bijela, kristalna, organska kiselina molekulske formule  $C_4H_6O_6$  i molarne mase 150,09 g/mol. Prirodno se javlja u mnogim biljkama, posebice u grožđu, te je jedna od glavnih kiselina koje se nalaze u vinu. Prema nomenklaturi IUPAC-a (Međunarodna unija za čistu i primjenjenu kemiju) naziva se 2,3-dihidroksibutandionska kiselina, kemijska struktura je prikazana na slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura vinske kiseline (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Soli vinske kiseline su poznate kao tartarati; kalijev tartarat, kalcijev tartarat, kalij-natrijev tartarat, dinatrijev tartarat. Vinsku kiselinu prvi put je iz kalijevog tartarata izolirao perzijski alkemičar Jabir Ibn Hayyan. Moderni proces razvio je 1796. Švedski kemičar Carl Wilhelm Scheele. Vinska kiselina je prisutna u raznom voću, ali se industrijski proizvodi jedino iz grožđa. U prirodi se pojavljuje desni izomer vinske kiseline (D-vinska kiselina) dok se industrijski sintezom dobiva racemična smjesa.

Vinska se kiselina sintetizira u mnogim biljkama, a najviše u plodovima vinove loze (*Vitis vinifera*, porodica *Vitaceae*). Obično se nakuplja kao kalijeva sol u lišću i grožđu. I plodovi nekoliko drugih biljaka akumuliraju vinsku kiselinu u značajnim količinama, primjerice tamarind (*Tamarindus indica*) i glog (*Crataegus*). Neke vrste kvasaca također sintetiziraju male količine vinske kiseline (Jackson, 2014).

Vinska kiselina je uz jabučnu kiselinu druga glavna kiselina u grožđu. Za razliku od jabučne, koncentracija vinske kiseline uglavnom ne opada tijekom zrenja grožđa, iako proizvodnja prestaje. U vinu se nalazi u obliku kalijevih i kalcijevih soli, a manje u slobodnom obliku. Najviše je zastupljena u obliku kalijeva hidrogentartarata (vinski kamen, striješ) i u manjem dijelu u obliku kalcijevog tartarata. Vinski kamen se često hvata za stijenke posuda u kojima je vino. Nekad su vinari sakupljali i prodavali vinski kamen iz bačava jer je bio sirovina za dobivanje vinske kiseline. Taloženje ovih soli ovisi o sadržaju alkohola, temperaturi i pH, naime taloženje je izraženije ako mošt ili vino sadrži više kiselina, veći postotak alkohola te uz više temperature. Problem vezan uz vinski kamen je zamućenje vina koje onda nema bistrinu. Za taloženje i stabilizaciju tartarata najbolje je izložiti vina niskim temperaturama. Kristalizacija tartarata je potpunija ako je temperatura vina niža i bliža njegovoj točki smrzavanja. Temperatura hlađenja je oko -4 do -5°C i cijelo vrijeme mora biti stalna, a vino se drži u izotermičkim cisternama 6 do 8 dana. Dobiveni talog predstavlja tartarate ili vinski kamen koji pada na dno ili ostaje na stijenkama bačve. Kad se odvoji 2,5 g vinskog kamena, ukupna kiselost se smanji za 1g/l. Umjesto hlađenja može se upotrijebiti i metavinska kiselina koja adsorpcijom inhibira stvaranje i taloženje tartarata (<http://www.vinogradarstvo.com>).

### **1.1.1. Primjena vinske kiseline**

Vinska se kiselina dodaje hrani radi postizanja kiselog okusa (regulator kiselosti), a koristi se i kao antioksidans. U prehrambenoj industriji koristi se najviše u pekarstvu kao emulgator i konzervans, zakiseljava i prirodno konzervira marmelade, sladoled, žele, sokove, konzerve i napitke. U gaziranoj vodi se dodaje kao efervescent. Na listi prehrambenih aditiva se nalazi pod e-brojem E334. U enologiji ima svrhu zakiselavanja jer spuštanje pH vrijednosti prilikom fermentacije sprečava razvoj nepoželjnih bakterija. Vinska kiselina je pomoćna tvar za izradu šumećih tableta u farmaceutskoj industriji, a u industriji kozmetike služi za podešavanje pH u kozmetičkim i proizvodima za osobnu njegu. Također ima primjenu u građevinarstvu gdje se upotrebljava u cementu, gipsu i žbuci kako bi se usporilo sušenje i olakšalo rukovanje tim materijalima (<https://www.tartaric.com/>). Vinska kiselina koristi se za stvaranje ugljičnog dioksida interakcijom s natrij bikarbonatom nakon oralne primjene. Ugljični dioksid proširuje želudac i pruža negativan kontrastni medij tijekom dvostruke kontrastne radiografije (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).



### **1.1.2. Vinska kiselina i ljudsko zdravlje**

U ljudskom tijelu većinu vinske kiseline metaboliziraju bakterije u debelom crijevu, a 15-20% nepromijenjene vinske kiseline se nađe u urinu. Pretjerana konzumacija može imati negativne učinke; iritacija gastrointestinalnog trakta, mučnina, povraćanje, dijareja, oštećenje bubrega, promjene u ponašanju (konvulzije, pospanost). Učestalo uzimanje u visokim dozama može izazvati lezije u ustima i čir na želucu (<https://www.drugbank.ca>).

## **1.2. Kromatografske metode odjeljivanja**

Termin kromatografija označava nekoliko sličnih tehnika koje omogućuju odjeljivanje različitih molekulskih vrsta u smjesi. Brojne su primjene kromatografije kako u laboratorijima tako i industriji: odjeljivanje i analiza lijekova, u kontroli lijekova i osiguranju kvalitete, u znanstvenim istraživanjima, itd. Uzorak se sastoji od analita i matriksa, gdje je analit molekula koja nas zanima, a matriks ostatak komponenti u smjesi. Kod odjeljivanja kolonskom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uzorak se uvodi u putujuću mobilnu fazu koja prolazi stacionarnom fazom. Kako mobilna faza prolazi, molekule iz uzorka ulaze u interakciju sa stacionarnom fazom koja ih zadržava jače ili slabije, bivaju eluirane u različito vrijeme i mogu biti detektirane raznim postupcima. Eluirane molekule se razlikuju od čestica mobilne faze po određenim fizikalno-kemijskim svojstvima (UV-apsorpcija, indeks refrakcije, fluorescencija, molekulska masa i fragmentacija u masenom spektrometru itd.), a ta svojstva omogućuju njihovu detekciju (Moldoveanu i David, 2014).

### **1.2.1. Podjela kromatografskih metoda**

Kromatografske se tehnike mogu temeljiti na raznim kriterijima kao što je priroda stacionarne faze, priroda mobilne faze, tipovi interakcija koji vode do odjeljivanja, ali i opseg koncentracija specifičnog otapala u mobilnoj fazi. Za rješavanje specifičnog problema analize/separacije potrebno je odabrati odgovarajuću kromatografsku tehniku. Ovdje su navedene neke vrste tekućinske kromatografije:

1. *Obrnuto fazna kromatografija* izvodi se na nepolarnoj stacionarnoj fazi s polarnom mobilnom fazom. Stacionarna faza obrnuto fazne kromatografije se može dobiti kemijskim vezivanjem dugih ugljikovodičnih lanaca za čvrstu površinu kao što je silikagel. Jedan česti tip lanca vezanog za silika gel je C18 (sadrži 18 atoma ugljika) dugi lanac s velikom hidrofobnošću. Mobilna faza je najčešće smjesa organskih otapala (CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>OH, izopropanol, itd.) s vodom, a mogu biti dodane i male količine pufera.
2. *Normalno fazna kromatografija* koristi polarnu stacionarnu fazu i nepolarnu mobilnu fazu za odjeljivanje polarnih spojeva. Kod ovog tipa kromatografije najviše nepolarni spojevi izlaze prvi iz kolone, a najviše polarni zadnji. Kao nepolarna mobilna faza najčešće se koriste otapala kao što je heksan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i tetrahidrofur.
3. *Ionsko-izmjenjivačka kromatografija* se koristi za odjeljivanje iona (anorganskih i organskih). U ovom tipu kromatografije je zadržavanje temeljeno na privlačenju između iona u otopini i suprotno nabijenih vrsta vezanih za stacionarnu fazu. Npr. anionske vrste B<sup>-</sup> iz otopine su zadržane kovalentnom vezom ionskih grupa tipa R-Y<sup>+</sup>, pri čemu se anion A<sup>-</sup> vezan na ionsku-izmjenjivačku smolu kao R-Y<sup>+</sup>A<sup>-</sup> zamjenjuje s anionom B<sup>-</sup>, a dva različita aniona B1<sup>-</sup> i B2<sup>-</sup> su odijeljeni temeljem različite snage zadržavanja. Sličan je princip i za kation-izmjenjivački tip. Mobilna faza kod ionsko-izmjenjivačke kromatografije je često otopina pufera.
4. *Gel filtracijska kromatografija* je tip raspodjele po veličini (size-exclusion) kromatografije gdje su molekule odijeljene ovisno o veličini (točnije njihovom hidrodinamičnom volumenu). Koriste se porozne čestice različitih veličina pora za odjeljivanje. Molekule koje su manje od pora stacionarne faze ulaze u njih i prolaze kroz zapetljane kanale stacionarne faze. Male molekule prolaze dulji put kroz kolonu, stoga imaju i dulje vrijeme zadržavanja. Neke velike molekule uopće ne mogu ući u pore i eluiraju se bez zadržavanja (Moldoveanu i David, 2016).

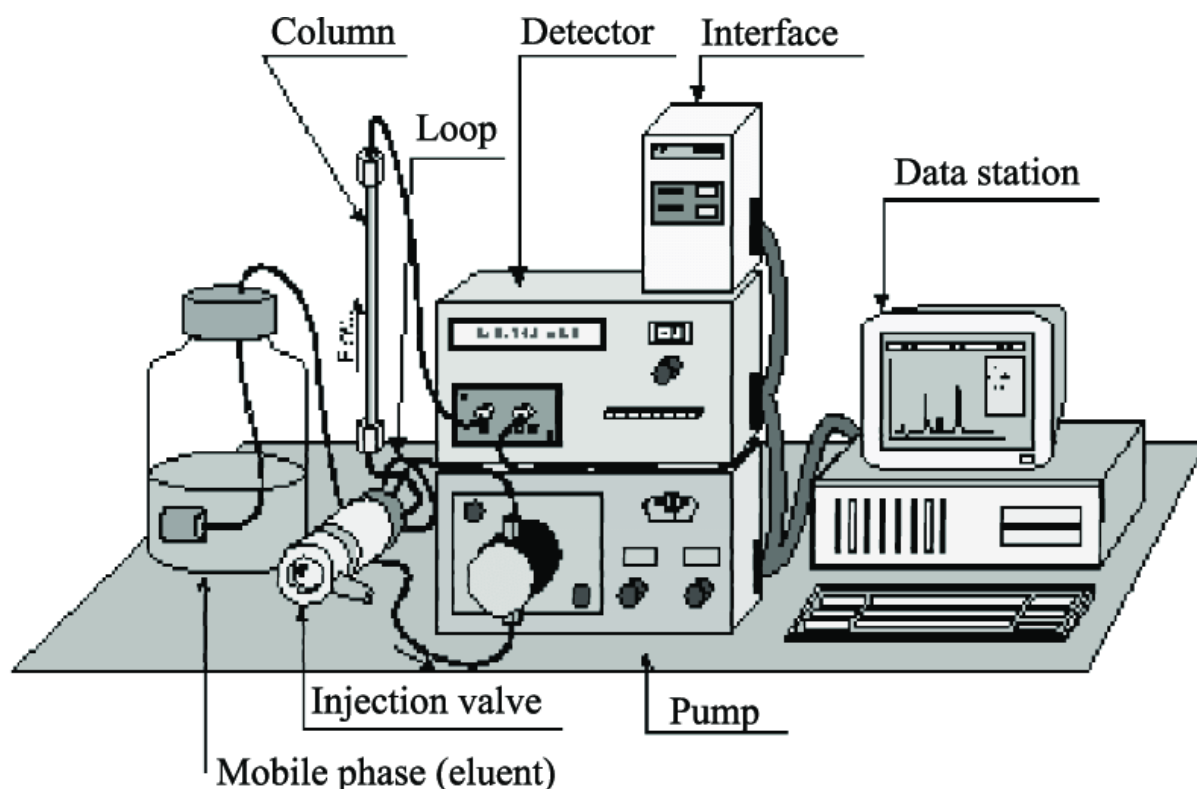
### **1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

HPLC je najčešća analitička tehnika za odjeljivanje i kvantitativnu analizu. U ovoj tehnici je mobilna faza tekuća i pod visokim tlakom prolazi kroz kolonu za odjeljivanje punjenu stacionarnom fazom. Povišen tlak mobilne faze diferencira HPLC od drugih tekućih kromatografskih tehnika. Odjeljenje komponente smjese eluirane u različito vrijeme

(retencijsko vrijeme,  $t_R$ ) se prikazuju kao pikovi na kromatogramu. Pikovi mogu biti različite visine (i površine) ovisno o brojnim faktorima kao primjerice količina analita u smjesi, količina uzorka koji je injektiran ili osjetljivost detekcije. Pošto je površina pika ovisna o količini spoja, HPLC se može koristiti za kvantifikaciju nakon propisne kalibracije. Na taj je način HPLC postao izvrsna tehnika za odjeljivanje i kvantifikaciju spojeva čak i u vrlo kompleksnim smjesama i jedna je od trenutno široko korištenih analitičkih tehnika (Moldoveanu i David, 2016).

### 1.2.3. Shematski opis HPLC instrumenta

Kad se koristi u analitičke svrhe, instrument za HPLC se sastoji od nekoliko komponenti koje su shematski prikazane na slici 2. Uređaj sadrži: sustav za opskrbu otapalom (spremnik mobilne faze i sustav za uklanjanje plinova), crpku za visoke tlakove, sustav za unošenje uzorka, kromatografsku kolonu (po mogućnosti s predkolonom), jedan ili više detektora i jednicu za obradu podataka.



Slika 2. Shematski prikaz HPLC kromatografa (Izvor: <https://www.researchgate.net/>)

## 1. Sustav opskrbe otapala i crpka

Sustav opskrbe otapala ima jedan ili više spremnika za otapala koja se koriste kao mobilna faza. Kod izokratne izvedbe (sastav mobilne faze je isti tijekom cijele kromatografije) i ako se koristi čisto ili predmiješano otapalo potreban je samo jedan spremnik. Ali kako je česta upotreba gradijentne izvedbe (sastav mobilne faze se mijenja) u kojoj su potrebna dva ili više otapala koja se miješaju pomoću crpke u različitim omjerima koriste se dva ili više spremnika. Spremnici moraju biti čisti i inertni za otapala. Neki sustavi opskrbe otapala imaju mogućnost uklanjanja otopljenih plinova u otapalima. Aparat za otplinjavanje je uređaj u kojem otapala prolaze kroz posebne polimerne cijevčice u vakuumskoj komori. Membrane cijevčica ostvaruju selektivnu propusnost plinova, a blagi vakuum stvoren pomoću male pumpe smanjuje sadržaj plinova iz otapala. Međutim, mogu se javiti određeni problemi, jer polimerne cijevčice mogu apsorbirati specifične sastojke otapala i tako biti izvor kontaminacije kod zamjene jednog otapala drugim. Kad plinovi nisu uklonjeni, pa čak i ako crpka radi ispravno, mogu se primijetiti fluktuacije tlaka ( 4-6% nominalnog tlaka, dok su normalne fluktuacije ispod 0,1 % nominalnog tlaka). Otopljeni plinovi također mogu utjecati na injekcijski volumen kad se koriste mali volumeni uzorka (npr. 1-2  $\mu$ l).

Crpka omogućava konstantni protok otapala kroz injektor, kromatografsku kolonu i detektor. Također mora proizvoditi visok tlak koji je potreban za svladavanje otpora protoku kroz kolonu. Konstantan protok bez pulsiranja se postiže recipročnim pumpama s više klipova.

## 2. Sustav za unošenje uzorka

Injektor uvodi u mobilnu fazu (na točan i reproducibilan način) precizno izmjeren volumen otopine koja sadrži uzorak. Jedan oblik injektora se sastoji od petlje određenog volumena u koju prvo ubacimo otopinu uzorka, a zatim pomoću preklopnog ventila uzorak prebacimo u protok otapala. Ovaj sistem dopušta ubacivanje ustaljenog volumena jednakog volumu petlje i tipičan je za ručne injektore. Ubrizgavanje različitih volumena se može izvesti upotrebom petlje većeg volumena koja je onda djelomično ispunjena uzorkom. Automatski injektori imaju sposobnost odabira željene vijale s uzorkom između većeg broja vijala i mogu ponoviti uzimanje uzorka i ubrizgavanje u točno određeno vrijeme ili kada prime električni signal iz računala. Pošto se injektira više uzoraka za redom, može doći do prijenosa male količine prethodnog uzorka i kontaminacije, ali se to može riješiti ispiranjem igle. U pogledu injektiranja još su bitna dva parametra: 1) priroda otapala uzorka i 2) volumen injektiranja.

Osim što otapalo mora potpuno otopiti uzorak, mora biti i topljivo u mobilnoj fazi. Ako se otapalo i mobilna faza razlikuju mogu različito eluirati analit što se vidi kod većih volumena injektiranja i utječe na oblik pika. Izbor volumena injektiranja ovisi o nekoliko faktora: tip uređaja (HPLC, UPLC, tip detektora itd.), osjetljivost detektora, kapacitet punjenja kolone, utjecaj otapala uzorka na oblik pika. Premali volumen injektiranja može izazvati problem s reproducibilnošću injektiranja ili osjetljivosti detektora ili gubitak uzorka u koloni. Preveliki volumen utječe na oblik pika (proširen, asimetričan, s ravnim vrhom) što utječe i na odjeljivanje.

### 3. Kromatografska kolona

Tijelo kolone je građeno od metalne (nehrđajući čelik) ili plastične (npr. PEEK) cijevi ispunjene stacionarnom fazom. Uobičajen unutarnji promjer analitičkih kolona je između 2 i 10 mm, a duljina između 50 i 250 mm, iako su moguće i druge dimenzije. Najčešći tip stacionarne faze za HPLC su još uvijek porozne čestice promjera 1,7-5  $\mu\text{m}$ . Poroznost je dobivena korištenjem silikagela s velikom površinom prekrivenom reaktivnim grupama (silanol Si-OH), visokom krutosti i otpornosti na drobljenje. Moguće su kemijske reakcije kovalentnim vezama silanolnih grupa na površini silikagela sa željenim organski vezanim grupama (ligandi) koji onda tvori sloj koji se ponaša kao stacionarna faza ovisno o tipu separacije koji nama treba.

### 4. Detektori

Izbor specifičnog detektora je vrlo važan korak u HPLC analizi i zbog tog se razloga u obzir uzimaju sljedeći faktori: 1) dostupnost instrumenta, 2) cilj analize, 3) kemijska priroda analita, ali i matriksa, 4) izvedba detektora koja uključuje osjetljivost, 5) potrebna kvaliteta rezultata, 6) tip elucije u odabranoj metodi, 7) svojstva mobilne faze u odabranoj metodi, 8) pouzdanost detektora i 9) posebne karakteristike detektora. Slijede opisi nekih vrsta detektora kod HPLC analize:

- A. DAD UV-Vis detektor mjeri apsorpciju eluenta koja je povezana s trenutnom koncentracijom analita. Kvantifikacija se može dobiti iz kalibracijskih krivulja vanjskog ili unutarnjeg standarda. Diode array detector (DAD) može istovremenom proizvesti više kromatograma različitih valnih duljina i snimiti cijeli UV spektar svakog pika. Apsorpcijski spektar se može još korisiti za provjeru čistoće pika i kod identifikacije analita.
- B. Upotreba FLUORESCENCIJSKOG detektora je ograničena na mjerenje analita koji pokazuju fluorescenciju. Fluorescencija se mjeri u protočnoj ćeliji koja je povezana s

tokom eluenta koji dolazi iz kromatografske kolone. Fluorescencijski detektori nisu univerzalni i imaju veću specifičnost od UV-Vis detektora.

- C. MASENI detektor u kombinaciji s HPLC odjeljivanjem stvara jedan od najboljih alata kemijske analize. LC-MS osigurava izvanrednu osjetljivost i selektivnost u usporedbi s drugim detektorima.
- D. EVAPORATIVE LIGHT-SCATTERING detektor (ELSD) je još jedan tip detektora, posebno za spojeve koji nemaju dobru apsorpciju, ne fluoresciraju i teško se ioniziraju. U ovoj tehnici se eluent uvodi u obliku sitnih kapljica pomoću raspršivača u odvodnu cijev gdje je raspršen plin. Odvodna cijev se zatim zagrijava i mobilna faza ispari dok nehlapjive čestice tvore finu maglicu. Maglica prolazi kroz ćeliju obasjanu zrakom svjetlosti i zabilježi se količina raspršenog svjetla na česticama analita. Intenzitet raspršenog svjetla je ovisan o koncentraciji analita (Moldoveanu i David, 2012).

### 1.3. Validacija metode

Cilj validacije analitičkog postupka je pokazati da je taj postupak prikladan za određenu primjenu. Validacija analitičkog postupka osigurava da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati. Analitičke značajke ispitivane u postupku validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost, radno područje, točnost i izdržljivost, a koji od tih parametara će se ispitivati u postupku validacije ovisi o namjeni analitičke metode (<https://www.ema.europa.eu/>).

#### 1.3.1. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava podudaranje između serija ponovljenih mjerenja na alikvotima istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Preciznost se može razmatrati s tri razine: ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) i obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost označava podudaranje rezultata mjerenjem pod istim uvjetima rada (isti analitičar, isti instrument, isti reagens, jedan laboratorij) u kratkom vremenskom razdoblju. Srednja preciznost izražava varijacije unutar istog laboratorija: različiti analitičar, različita oprema, duži period. Obnovljivost izražava slaganje rezultata između različitih laboratorija. Preciznost se najčešće

prikazuje kao relativno standardno odstupanje (RSD, %). Utvrđuje se mjerenjem uzorka pet do šest puta na najmanje dvije različite koncentracije analita (<https://www.ema.europa.eu/>).

### **1.3.2. Specifičnost/selektivnost**

Specifičnost je mogućnost nedvojbenog raspoznavanja analita u prisutnosti drugih očekivanih komponenti kao što su: onečišćenja, matriks, razgradni spojevi i dr. (Nigović i sur., 2014).

### **1.3.3. Linearnost**

Linearnost analitičkog postupka je mogućnost dobivanja rezultata (unutar datog područja) koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Dobiva se određivanjem serija uzorka tri do šest puta na najmanje pet različitih koncentracija analita, a grafičkim prikazom ovisnosti analitičkog signala o koncentraciji analita dobije se kalibracijska krivulja. Linearnost se zatim iskazuje koeficijentom korelacije regresijskog pravca pri čemu mora vrijediti  $R^2 > 0,999$  (<https://www.ema.europa.eu/>; Nigović i sur., 2014).

### **1.3.4. Radno područje**

Radno područje analitičkog postupka prikazuje interval između gornje i donje koncentracije analita u uzorku (uključene su i te koncentracije) za koje je dokazano da analitički postupak daje prihvatljiv stupanj preciznosti, točnosti i linearnosti (<https://www.ema.europa.eu/>).

### **1.3.5. Točnost**

Točnost analitičkog postupka izražava preklapanje srednje vrijednosti izmjerenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Točnost se prikazuje kao postotak analitičkog prinosa (engl. recovery) pri čemu je  $x$  srednja izmjerena vrijednost, a  $y$  stvarna vrijednost analita u uzorku, a formula glasi:

$$R = \frac{x}{y} \times 100$$

Točnost se utvrđuje mjerenjem uzorka najmanje tri puta za najmanje tri koncentracije unutar radnog područja (<https://www.ema.europa.eu/>).

### 1.3.6. Granica dokazivanja

Granica dokazivanja (engl. limit of detection; LOD) u analitičkom postupku je najmanja koncentracija (količina) analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i nužno kvantitativno određena u utvrđenim uvjetima analitičkog postupka. LOD se dobiva razrjeđenjem ispitivane otopine. Formula za računanje LOD je:

$$\text{LOD} = \frac{3,3x\sigma}{a}$$

pri čemu je  $a$  nagib pravca, a  $\sigma$  standardno odstupanje signala slijepih uzoraka, odnosno standardno odstupanje regresijskog pravca u radnom području ili standardno odstupanje odsječka na osi y regresijskog pravca (<https://www.ema.europa.eu/>).

### 1.3.7. Granica određivanja

Granica određivanja (engl. limit of quantitation; LOQ) analitičkog postupka je najmanja koncentracija (količina) analita u uzorku koja može biti kvantitativno određena uz zadovoljavajuću preciznost i točnost u zadanim uvjetima metode. LOQ se određuje na isti način kao i LOD, odnosno razrjeđivanjem ispitivane otopine, a računa prema formuli:

$$\text{LOQ} = \frac{10x\sigma}{a}$$

gdje je  $a$  nagib pravca, a  $\sigma$  standardno odstupanje signala slijepih uzoraka, odnosno standardno odstupanje regresijskog pravca u radnom području ili standardno odstupanje odsječka na osi y regresijskog pravca (<https://www.ema.europa.eu/>).

### 1.3.8. Izdržljivost

Izdržljivost analitičkog postupka je mjera sposobnosti metode da ostane neizmijenjena kad se malo, ali namjerno promijene parametri metode. Kod tekućinske kromatografije se na primjer može gledati utjecaj promjene pH mobilne faze, promjena sastava mobilne faze, temperatura, kolone, brzina protoka mobilne faze, itd. Procijenjuje se mjenjanjem jednog parametra, a ostali parametri ostaju nepromijenjeni. Odabir parametra ovisi o samoj metodi.



Izdržljivost nam omogućuje da vidimo koliko je pouzdana analitička metoda dok se normalno primjenjuje u realnim uvjetima analize (Nigović i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Vinska kiselina je organska kiselina prisutna u biljkama, a najviše u grožđu, bananama i tamarindu. Uglavnom se proizvodi iz otpada vinske industrije. U prehrambenoj industriji se najviše koristi kao regulator kiselosti (E334), antioksidans, emulgator i konzervans.

Unos prekomjerne količine vinske kiseline može imati štetan učinak na ljudski organizam. Zbog toga je potrebno kontrolirati količinu vinske kiseline kao aditiva u prehrambenim namirnicama, a pogotovo u pripravcima koji i prirodno sadrže određenu količinu vinske kiseline.

Cilj ovog istraživanja je uvesti brzu, preciznu, osjetljivu i jeftinu HPLC metodu te odrediti koncentraciju vinske kiseline u uzorcima komercijalnih voćnih nektara i voćnih sokova pomoću validirane HPLC metode s UV/Vis detektorom.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Kemikalije**

#### **3.1.1. Korištene kemikalije:**

- metanol, CH<sub>3</sub>OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- vinska kiselina, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- ortofosforna kiselina, o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Kemika, Zagreb, Hrvatska

Metanol korišten za kondicioniranje HPLC uređaja bio je HPLC čistoće, a sve ostale kemikalije *p.a.* čistoće, dok je za pripremanje otopina korištena ultračista voda (MilliQ).

### **3.2. Aparatura**

#### **3.2.1. Korištena aparatura:**

- analitička vaga,
- HPLC uređaj, Knauer, Berlin, Njemačka
- pH metar, MP220, Mettler Toledo, Španjolska
- ultrazvučna kupelj, Transsonic T570, Elma, Singen, Njemačka
- jednokratni filter, Minisart RC 25, veličina pora 0,45 μm, Sartorius Stedim, Goettingen, Njemačka

#### **3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a:**

- izokratna pumpa (model 64, Knauer, Berlin, Njemačka)
- analitička kolona, obrnuta faza, C18, dimenzija 125,0 x 4,6 mm s punilom veličine 5 μm (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka)
- manualni injektor (Rheodyne 7010) s petljom volumena 100 μL
- UV/Vis detektor (model UV-1, Knauer, Berlin, Njemačka)
- Softver Eurochrom 2000 Software (Knauer, Berlin, Njemačka)

#### **3.2.3. Uvjeti na HPLC-u:**

HPLC uređaj je na početku i kraju rada kondicioniran s 50%-tnom otopinom metanola. 50%-tnoj otopini metanola i mobilnoj fazi je prije upotrebe na HPLC uređaju uklonjen zrak stavljanjem na ultrazvučnu kupelj dva puta po 15 minuta.

Mobilna faza je bila 50 mM otopina fosfatnog pufera pripremljena otapanjem kalijevog dihidrogenfosfata u ultračistoj vodi i podešavanjem pH na 2,8 ortofosfornom kiselinom.

Protok mobilne faze je bio podešen na 0,5 mL/min.

Volumen injektiranih standardnih otopina vinske kiseline i uzoraka bio je 50  $\mu$ L.

Valna duljina na UV/Vis detektoru je bila podešena na 214 nm, a obrada dobivenih rezultata izvršena pomoću softvera Eurochrom 2000 Software.

### **3.3. Uzorci**

Kao uzorci za analizu su uzeti voćni nektari i sokovi, njih ukupno deset (n=10), od čega je sedam voćnih nektara različitih proizvođača i različitog sastava, a tri uzorka su deklarirana kao prirodni voćni sok. Analizirani su nektari i sokovi od jabuke, naranče, limuna, grožđa i različiti nektari više vrsta voća koji su sadržavali i grožđe.

### **3.4. Određivanje koncentracije vinske kiseline HPLC-om**

#### **3.4.1. Priprema otopina**

##### **1) Mobilna faza**

50 mM otopina fosfatnog pufera (pH=2,8) korištena je kao mobilna faza. Za izradu 1,00 L pufera na analitičkoj vagi je izvagano 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (M=136,09 g/mol), kvantitativno preneseno u čašu od 1L te otopljeno u ultračistoj vodi. Da bi vinska kiselina ostala u protoniranom obliku i ostvarila najbolje interakcije s C18 stacionarnom fazom kolone potreban je kiseli pH mobilne faze. Otopini je podešen pH na 2,8 dodavanjem ortofosforne kiseline i prebačena je u odmjernu tikvicu koja je onda nadopunjena do 1000,00 mL ultračistom vodom. Pripremljena mobilna faza je prije korištenja na HPLC uređaju stavljena u ultrazvučnu kupelj dva puta po 15 minuta da se ukloni višak otopljenog zraka koji bi mogao oštetiti HPLC uređaj.

##### **2) Matična otopina vinske kiseline**

Matična otopina vinske kiseline pripremljena je otapanjem 200 mg komercijalno pribavljene vinske kiseline u 100,00 mL ultračiste vode. Koncentracija te otopine je iznosila 2g/L.

##### **3) Standardne otopine vinske kiseline**

Iz matične otopine vinske kiseline pripremljen je niz standardnih otopina u koncentracijskom rasponu od 0,125 g/L do 1,0 g/L razrjeđivanjem matične otopine s ultračistom vodom. Postupak pripreme tih standardnih otopina je prikazan u tablici 1. Tako pripremljene standardne otopine injektirane su u HPLC uređaj.

Tablica 1. Koncentracije i postupak pripreme standardnih otopina vinske kiseline razrjeđivanjem

koncentracija standardne otopine vinske kiseline (g/L)	postupak pripreme standardnih otopina vinske kiseline	ukupno razrjeđenje matične otopine vinske kiseline
<b>0,1</b>	500 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	20x
<b>0,125</b>	625 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	16x
<b>0,25</b>	1250 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	8x
<b>0,5</b>	2500 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	4x
<b>0,75</b>	3750 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	2,6x
<b>1,0</b>	5000 µL matične otopine vinske kiseline koncentracije 2 g/L nadopunjeno je ultračistom vodom do 10 mL	2x



### 3.4.2. Priprema uzoraka

Uzorci voćnih nektara i sokova pripremljeni su razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:9, odnosno 2:8 u odmjernim tikvicama od 10,00 mL. Postupak pripreme uzoraka iz voćnih nektara je prikazan u tablici 2, a u tablici 3 je isti postupak za uzorke iz voćnih sokova. Voćni nektari i sokovi koji su imali zamućenje ili talog profiltrirani su korištenjem šprice kroz jednokratni filter pora veličine 0,45 µm. Tako pripremljeni uzorci su injektirani u HPLC uređaj.

Tablica 2. Uzorci voćnih nektara i postupak razrjeđivanja

Uzorci voćnih nektara	Postupak razrjeđenja ultračistom vodom
<b>Uzorak 1, nektar od jabuke</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 2, nekta od naranče</b>	2 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 3, nektar od naranče i limuna</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 4, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, limun, crveno voće)</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 5, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, crveno voće)</b>	2 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 6, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, crveno voće)</b>	2 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 7, nektar miješanog voća (citrusi, grožđe, tropsko voće)</b>	2 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml

Tablica 3. Uzorci voćnih sokova i postupak razrjeđivanja

Uzorci voćnih sokova	Postupak razrjeđenja ultračistom vodom
<b>Uzorak 1, sok od crvenog grožđa</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 2, sok od crvenog grožđa</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml
<b>Uzorak 3, sok od miješanog voća (grožđe, jabuka, crveno voće)</b>	1 ml uzorka je nadopunjeno ultračistom vodom do 10 ml

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Određivanje vinske kiseline primjenom HPLC-a s UV/Vis detektorom

Za određivanje vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima u ovom istraživanju korištena je HPLC metoda obrnute faze s UV/Vis detektorom koji je bio podešen na 214 nm. Prema literaturnim podacima, valna duljina detekcije vinske kiseline UV/Vis detektorom je u rasponu od 210 nm do 226 nm.

Za analizu organskih kiselina koristi se obrnuto fazna HPLC metoda s C18 stacionarnom fazom kromatografske kolone i 100% vodena otopina mobilne faze da se postigne odgovarajuće zadržavanje vinske kiseline na koloni pošto je slaba organska kiselina s polarnim skupinama i malom molarnom masom ( $M=150,09$  g/mol). Pripremljenu mobilnu fazu 50 mM otopine fosfatnog pufera kako je opisano u poglavlju Materijali i metode, podesili smo na  $\text{pH}=2,8$  da bi vinska kiselina ostala protonirana ili neutralna i kako bi se postigle najbolje interakcije sa stacionarnom fazom (Kowalski i Wittring, 2007). U ovom istraživanju protok mobilne faze podešen je na 0,5 ml/min i tlak od 16,7 MPa.

U postavljenim uvjetima analize (C18 obrnuto-fazna kromatografska kolona veličine punila 5  $\mu\text{m}$  i dimenzija 125,0 x 4,6 mm, 50 mM fosfatni pufer  $\text{pH}=2,8$  kao mobilna faza protoka brzine 0,5 ml/min i valna duljina detektora 214 nm) dobiven je kromatogram bazne linije bez interferencija.

U istim uvjetima dobiveni su kromatogrami standardnih otopina vinske kiseline koncentracija 0,125 g/L i 0,25 g/L prikazani na slikama 3 i 4. Iz tih kromatograma se može očitati vrijeme zadržavanja vinske kiseline na koloni koje je bilo oko 1,2 min. Kako je ukupna analiza trajala 10 min, možemo zaključiti da je ova metoda određivanja koncentracije vinske kiseline brza.

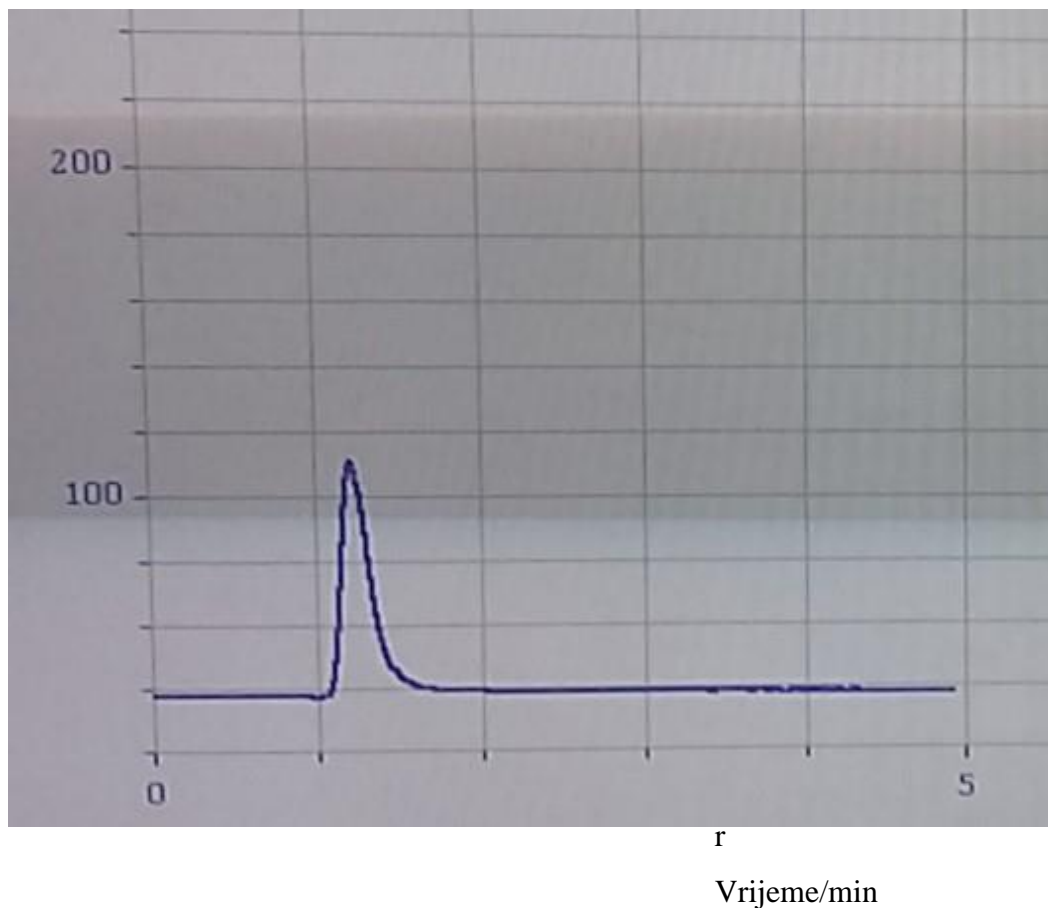
Odziv  
detektora/mAU



Vrijeme/min

Slika 3. Kromatogram standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,125 g/L dobiven HPLC metodom s UV/Vis detektorom.

Odaziv  
detektora/mAU



Slika 4. Kromatogram standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,25 g/L dobiven HPLC metodom s UV/Vis detektorom

#### 4.2. Validacija metode određivanja vinske kiseline HPLC-om s UV/Vis detektorom

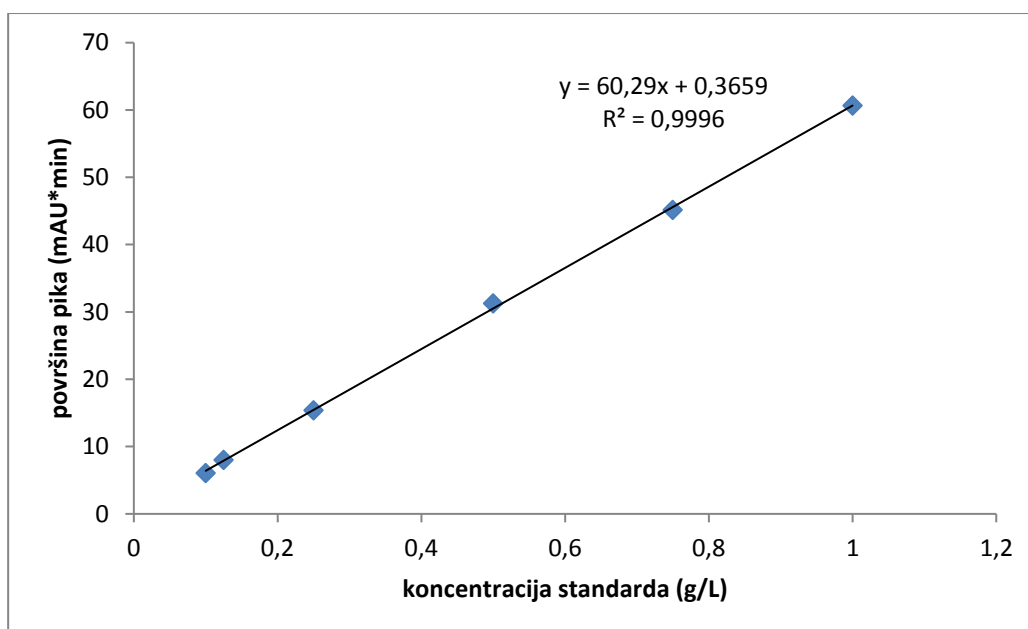
Validacija analitičkog postupka osigurava da će se u propisanim uvjetima njegove primjene dobiti valjani rezultati, a njezin je cilj pokazati da je analitički postupak prikladan za određenu primjenu. Validacija je obavezna za svaki analitički postupak, ali namjena same metode određuje koji će se parametri validacije ispitivati.

Metoda za određivanje vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima je u ovom istraživanju validirana. Za validaciju upotrijebljene su standardne otopine vinske kiseline u rasponu koncentracija od 0,1 g/L do 1 g/L, opis pripreme tih otopina nalazi se u poglavlju Materijali i metode. Validacijski parametri koji su ispitani prilikom validacije su: linearnost, preciznost, granica dokazivanja i granica određivanja.

#### 4.2.1. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka je sposobnost davanja rezultata ispitivanja unutar određenog područja koji su proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određuje se mjerenjem tri do šest puta serije uzoraka na najmanje pet različitih koncentracija. Grafičkim prikazom rezultata mjerenja dobije se kalibracijska krivulja gdje koeficijent korelacije regresijskog pravca ( $R^2$ ) izražava linearnost i treba iznositi više od 0,999.

Da bi izradili kalibracijski pravac i ispitili linearnost metode, napravljena je serija standardnih otopina vinske kiseline u rasponu koncentracija od 0,1 g/L do 1,0 g/L i analizirana četiri puta. Iz dobivenih vrijednosti odgovora detektora, odnosno površina pika, za svaku koncentraciju standardne otopine izračunata je srednja vrijednost. Prikazom ovisnosti tih srednjih vrijednosti površina pika o koncentraciji standardnih otopina dobiven je kalibracijski pravac na slici 5. Jednadžba pravca dobivena regresijskom analizom glasi  $y=60,29x+0,3659$ , a koeficijent korelacije  $R^2=0,9996$ . Iz jednadžbe pravca i koeficijenta korelacije regresijskog pravca zaključeno je da je odabrana metoda linearna u koncentracijskom području od 0,1 g/L do 1,0 g/L i moguća je primjena u određivanju koncentracija vinske kiseline.



Slika 5. Kalibracijski pravac standardnih otopina vinske kiseline u rasponu koncentracija 0,1-1,0 g/L

#### 4.2.2. Preciznost

Preciznost analitičkog postupka izražava podudaranje između serija ponovljenih mjerenja na alikvotima istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Iskazuje se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Preciznost se najčešće prikazuje kao relativno standardno odstupanje (RSD, %). Utvrđuje se mjerenjem uzorka pet do šest puta na najmanje dvije različite koncentracije analita.

Da bi se ispitala ponovljivost metode analizirana je uzastopce (četiri do pet puta) standardna otopina vinske kiseline u rasponu koncentracija od 0,125 g/L do 1,0 g/L. Iz dobivenih mjerenja izračunata je relativna standardna devijacija (RSD), a prikaz takvih rezultata za standardnu otopinu vinske kiseline koncentracije 0,75 g/L nalazi se u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati mjerenja standardne otopine vinske kiseline koncentracije 0,75 g/L u kratkom vremenskom intervalu (ponovljivost)

Standardna otopina vinske kiseline koncentracije 0,75 g/L	Površina pika (mAU*min)
<b>1. mjerenje</b>	45,0295
<b>2. mjerenje</b>	44,8475
<b>3. mjerenje</b>	45,1615
<b>4. mjerenje</b>	45,3804
<b>5. mjerenje</b>	45,3626
<b>Srednja vrijednost površine pika (X)</b>	45,1563
<b>Standardna devijacija (SD)</b>	0,225966
<b>Relativna standardna devijacija (RSD/%)</b>	0,500409

U tablici 5 prikazane su izračunate RSD vrijednosti dobivene mjerenjem ostalih koncentracija standardnih otopina.



Tablica 5. Rezultati ponovljivosti iz analize standardnih otopina vinske kiseline koncentracija 0,125 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L i 1,0 g/L

Koncentracija standardne otopine vinske kiseline (g/L)	RSD (%)
<b>0,125</b>	1,182
<b>0,25</b>	1,321
<b>0,5</b>	0,476
<b>1,0</b>	0,877

Iz dobivenih RSD vrijednosti koje su manje od 2% može se zaključiti da je metoda precizna za određivanje koncentracije vinske kiseline.

Osim ponovljivosti ispitana je i srednja preciznost za ovu metodu. Mjerene su površine pika standardnih otopina vinske kiseline na tri različite koncentracije unutar duljeg vremenskog perioda. Svaka otopina je ispitivana pet puta kroz tri dana, a izračunate relativne standardne devijacije prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Rezultati mjerenja standardnih otopina vinske kiseline na tri koncentracije unutar tri dana (srednja preciznost)

Koncentracija standarda vinske kiseline (g/L)	RSD (%)
<b>0,125</b>	2,1466
<b>0,5</b>	2,5073
<b>1,0</b>	2,9073

Ispitivana metoda je prikladna za određivanje koncentracije vinske kiseline u nepoznatom uzorku što se može zaključiti iz dobivenih RSD vrijednosti koje nisu veće od 3%.

### **4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja**

Granica dokazivanja (LOD) u analitičkom postupku je najmanja koncentracija analita koja može biti dokazana u uzorku, ali ne i određena. Najmanja koncentracija analita koja može biti kvantitativno određena u uzorku u zadanim uvjetima uz odgovarajuću preciznost i točnost je granica određivanja (LOQ).

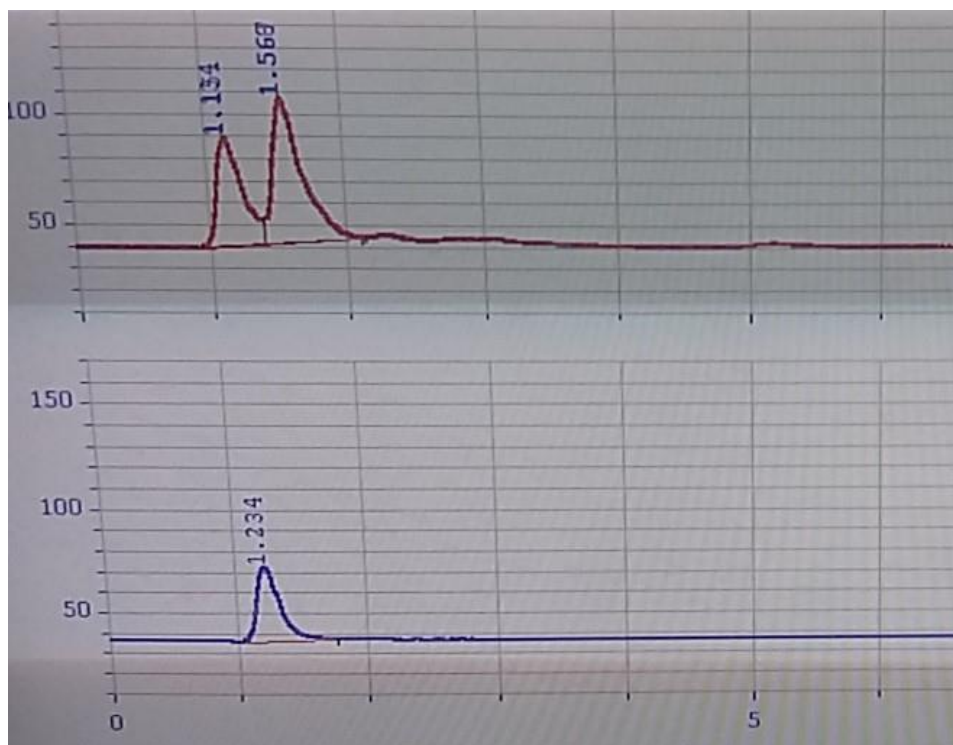
Iz nagiba kalibracijskog pravca i prema formulama koje su navedene u poglavlju Uvod izračunati su LOD i LOQ; granica dokazivanja je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,04 g/L. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako se u nepoznatom uzorku može pouzdano odrediti koncentracija vinske kiseline od 0,04 g/L i da je metoda dovoljno osjetljiva.

### **4.3. Primjena validirane HPLC metode s UV/Vis detektorom za određivanje koncentracije vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima**

Pripremljeni uzorci voćnih nektara i sokova na način koji je opisan u poglavlju Materijali i metode injektirani su i analizirani HPLC-om, a zatim detektirani UV/Vis detektorom.

U analiziranim uzorcima voćnih nektara i sokova dobiveno je više od jednog signala/pika na kromatogramu. Usporedbom vremena zadržavanja sastojaka uzorka s vremenom zadržavanja standardne otopine vinske kiseline (oko 1,2 min) može se sa sigurnošću odrediti koji je signal/pik vinske kiseline u ispitivanim uzorcima nektara i sokova.

Odaziv  
detektora  
/mAU



Vrijeme (min)

Slika 6. Kromatogrami jednog od uzoraka voćnog nektara i standardne otopine vinske kiseline dobiveni HPLC-om s UV/Vis detektorom

Svaki uzorak voćnog nektara i soka mjereno je višestruko, pa je izračunata srednja vrijednost površine pika. Korištenjem jednadžbe kalibracijske krivulje izračunate su i koncentracije vinske kiseline u svakom uzorku. Dobiveni rezultati nalaze se u tablicima 7 i 8.

Tablica 7. Koncentracije i površine pikova vinske kiseline u uzorcima voćnih nektara

Uzorci voćnih nektara	Površina pika (mAU*min)	Koncentracija vinske kiseline u razrijeđenim uzorcima (g/L)	Koncentracija vinske kiseline u voćnim nektarima (g/L)
<b>Uzorak 1, nektar od jabuke</b>	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Uzorak 2, nektar od naranče</b>	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Uzorak 3, nektar od naranče i limuna</b>	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Uzorak 4, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, limun, crveno voće)</b>	18,687	0,3039	3,039
<b>Uzorak 5, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, crveno voće)</b>	14,796	0,2393	1,1965
<b>Uzorak 6, nektar od više vrsta voća (jabuka, grožđe, crveno voće)</b>	7,221	0,1137	0,5685
<b>Uzorak 7, nektar miješanog voća (citrusi, grožđe, tropsko voće)</b>	15,472	0,2506	1,253

n.d. – nije detektirana

Tablica 8. Koncentracije i površine pikova vinske kiseline u uzorcima voćnih sokova

Uzorci voćnih sokova	Površina pika (mAU*min)	Koncentracija vinske kiseline u analiziranim razrijeđenim uzorcima (g/L)	Koncentracija vinske kiseline u voćnim sokovima (g/L)
<b>Uzorak 1, sok od crvenog grožđa</b>	25,748	0,421	4,21
<b>Uzorak 2, sok od crvenog grožđa</b>	28,697	0,4699	4,699
<b>Uzorak 3, sok od miješanog voća (grožđe, jabuka, crveno voće)</b>	24,008	0,3921	3,921

Nakon provedene analize potvrđena je prisutnost vinske kiseline u četiri uzorka voćnih nektara (4, 5, 6 i 7) i u sva tri uzorka voćnih sokova te određena količina vinske kiseline za nektare i sokove u rasponu od 0,57 g/L (uzorak 6, nektar s miješanim voćem i grožđem) do 4,70 g/L (uzorak 2, sok od crvenog grožđa).

Na deklaracijama voćnih nektara nije naznačena količina sadržane vinske kiseline pa ih ne možemo usporediti s dobivenim rezultatima analize. Ipak postoje regulacije prehrambenih aditiva u Republici Hrvatskoj kao što je Pravilnik o prehrambenim aditivima NN 62/2010 i njegove izmjene i dopune NN 62/2011, NN 135/2011 i NN 79/2012 (Pravilnik, 2010). Taj pravilnik i njegove izmjene u skladu su s Uredbom komisije EU br. 1129/2011 koji regulira prehrambene aditive na području Europske Unije. Za vinsku kiselinu kao prehrambeni aditiv E334 stoji da se koristi kao regulator kiselosti *quantum satis* što znači da nije određena najviša numerička vrijednost i da se aditiv upotrebljava u skladu s dobrom proizvođačkom praksom (DPP) u količini koja nije viša od nužne za postizanje svrhe (<https://op.europa.eu>).

FDA (Food and Drug Administration, odnosno Agencija za hranu i lijekove) za vinsku kiselinu na listi statusa aditiva navodi da je GRAS (Generally Recognized as Safe) što u prijevodu znači općenito prepoznat kao siguran temeljem znanstvenih dokaza ili dugogodišnjom primjenom (<https://fda.gov/>).

U literaturi se nalazi podatak za dopušteni dnevni unos (ADI, Acceptable daily intake) vinske kiseline i njezinih soli kao aditiva koji iznosi 30 mg/kg tjelesne težine (Smith i Hong-Shum, 2011). Međutim Europska agencija za hranu, EFSA (European Food Safety Authority) u siječnju je 2020. godine donijela novi dopušteni dnevni unos vinske kiseline i njezinih soli od 240 mg/kg tjelesne težine (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/>; Younes i sur., 2020).

Niti jedan od analiziranih uzoraka voćnih nektara i sokova nema na deklaraciji naznačen podatak da sadrži vinsku kiselinu kao aditiv. U uzorcima nektara koji sadrže jabuku i citrus vrste (uzorci 1, 2 i 3) nije detektirana vinska kiselina primjenom ove metode što ukazuje na to da vinska kiselina nije prisutna u tim uzorcima. Za uzorke voćnih nektara koji uz ostale voćne sastojke sadrže i grožđe (uzorci 4, 5, 6 i 7) koncentracija vinske kiseline je bila u rasponu 0,57 – 3,04 g/L pa se može pretpostaviti da vinska kiselina potječe od grožđa sadržanog u nektaru.

Svi uzorci voćnih sokova su od grožđa (uzorci 8 i 9) ili sadrže više vrsta voća, uključujući grožđe kao glavni sastojak (uzorak 10). U tim je sokovima određena vinska kiselina u većoj koncentraciji (3,92 – 4,70 g/L) pa se može zaključiti da količina vinske kiseline potječe samo od grožđa.

Prema najnovijem dopuštenom dnevnom unosu od 240 mg/kg tjelesne težine koji donosi EFSA, za prosječnu osobu težine 60 kg to bi iznosilo 14,4 g vinske kiseline. U analiziranim uzorcima voćnih nektara i sokova najviša koncentracija vinske kiseline od 4,70 g/L pronađena je u uzorku 2 (voćni sok od crvenog grožđa). Usporedbom s dopuštenim dnevnim unosom, može se zaključiti da niti u jednom uzorku voćnog soka nije prekoračena dopuštena dnevna količina vinske kiseline koja se može unijeti u organizam.

HPLC metoda za određivanje vinske kiseline u uzorcima voćnih nektara i sokova pokazala se brзом, preciznom i osjetljivom, a ujedno i *zelenom* metodom jer je korištena 100% vodena mobilna faza.

## **5. ZAKLJUČCI**

Temeljem provedenog istraživanja koncentracije vinske kiseline u uzorcima komercijalnih voćnih nektara i sokova te dobivenih rezultata, može se zaključiti da je upotrijebljena HPLC metoda s UV/Vis detektorom precizna, brza i osjetljiva za određivanje vinske kiseline u voćnim nektarima i sokovima.

U analiziranim voćnim uzorcima nektara i sokova (n=10) koncentracija vinske kiseline bila je u rasponu 0,57 – 4,70 g/L što je u skladu s dopuštenim dnevnim unosom vinske kiseline reguliranim europskim propisima EFSA. Može se zaključiti da je količina vinske kiseline u uzorcima prihvatljiva za svakodnevnu uporabu i bezopasna za ljudsko zdravlje ako se ne prekorači dopušteni dnevni unos.



## **6. LITERATURA**

E334 Vinska kiselina, <https://e-brojevi.udd.hr>, pristupljeno 13. 8. 2020.

Food Aditive Status list, 2019, <https://www.fda.gov/>, pristupljeno 10. 8. 2020.

ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, <https://www.ema.europa.eu/> pristupljeno 23. 4. 2020.

Jackson S. R. Wine Science: Principles and Applications. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2014, str. 359.

L-tartaric acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.gov>, pristupljeno 20. 5. 2020.

Moldoveanu S, David V. Essentials in Modern HPLC Separations. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2012, str. 9 – 38.

Moldoveanu S, David V. Modern Sample Preparation for Chromatography. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2014, str. 51 – 53.

Moldoveanu S, David V. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Cambridge (Massachusetts), Elsevier, 2016, str. 71 – 76.

Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova-praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135 – 138.

Pravilnik o prehrambenim aditivima, 2010, Zagreb, Narodne novine, broj 62 (NN/62/10).

Smith J, Hong-Shum L. Food Additives Data Book. 2.izdanje, Hoboken, Wiley-Blackwell, 2011, str. 58.

Stabilizacija tartarata, [www.vinogradarstvo.com](http://www.vinogradarstvo.com), pristupljeno 21. 5. 2020.

Tartaric acid, <https://www.drugbank.ca/>, pristupljeno 5. 8. 2020.

Tartaric acid, <https://www.tartaric.com/>, pristupljeno 21. 5. 2020.

Uredba Komisije (EU) br. 1129/2011, <https://op.europa.eu/>, pristupljeno 5. 8. 2020.

Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel K, Fowler P, Frutos Fernandez M, i drugi. Re-valuation of L(+)-tartaric acid (E 334), sodium tartrates (E 335), potassium tartrates (E 336),

potassium sodium tartrate (E 337) and calcium tartrate (E 354) as food additives. *Efsa Journal*, ožujak 2020, 18 (3), <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/>, pristupljeno 5. 8. 2020.

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Vinska kiselina ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji se u obliku aditiva (E334) koristi kao regulator kiselosti. Ako se prekomjerno unosi u organizam, može biti štetna za ljudsko zdravlje. U ovom diplomskom radu određena je koncentracija vinske kiseline u komercijalnim uzorcima voćnih nektara i sokova primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, Knauer, Berlin, Njemačka) uz UV/Vis detektor. Korišten je 50 mM fosfatni pufer pH =2,8 kao mobilna faza na koloni obrnute faze (LiChrospher RP-18, 125x4,6 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Njemačka). Validacija metode ispitana je korištenjem standardnih otopina vinske kiseline u rasponu koncentracija od 0,1 g/L do 1,0 g/L. Metoda je bila linearna u ispitivanom području ( $R^2 = 0,9996$ ). Ponovljivost metode iskazana kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je ispod 2%, a srednja preciznost iskazana kao RSD bila je manja od 3%. Granica dokazivanja iznosila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,04 g/L što ukazuje na osjetljivost metode. Vinska kiselina nije detektirana u tri uzorka voćnih nektara, a u četiri uzorka koncentracija je bila u rasponu 0,57 – 3,04 g/L. Razina vinske kiseline u tri prirodna voćna soka bila je u rasponu 3,92 g/L – 4,70 g/L i u skladu je s europskim propisima o dopuštenom dnevnom unosu vinske kiseline. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je potrebno pratiti količinu vinske kiseline u svim prehrambenim proizvodima kako se ne bi prekoračio dopušteni dnevni unos vinske kiseline.

Tartaric acid is widely used in food and pharmaceutical industry. In food industry is used as acidulant and added in products as additive (E334). Higher intake of tartaric acid can be harmful to human health. In this thesis, the concentration of tartaric acid was determined in samples of commercially available fruit nectars and juices by using high performance liquid chromatography (HPLC, Knauer, Berlin, Germany) with UV/Vis detector. It was used 50 mM phosphate buffer pH = 2,8 as mobile phase on reversed phase column (LiChrospher RP-18, 125x4,6 mm, 5  $\mu$ m, Merck, Darmstadt, Germany). Validation of the method was tested with standard tartaric acid solutions in range of concentrations of 0,1 g/L to 1,0 g/L. Method was linear ( $R^2 = 0,9996$ ). The repeatability of the method expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 2 %, and the intermediate precision expressed as RSD was less than 3%. The limit of detection was 0,01 g/L, and the limit of quantification was 0,04 g/L which indicates sensitivity of the method. Tartaric acid was not detected in three samples of fruit nectar, in four samples the concentration of tartaric acid ranged from 0,57 g/L to 3,04 g/L. Level of tartaric acid in three samples of natural fruit juices was in range from 3,92 g/L to 4,70 g/L according to the european regulations of the acceptable daily intake of tartaric acid. From the obtained results it can be concluded that it is important to monitor the concentration of tartaric acid in all food products in order not to exceed the allowable daily intake of tartaric acid.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitičku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

# ODREĐIVANJE VINSKE KISELINE U VOĆNIM NEKTARIMA I SOKOVIMA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI

**Barbara Hren**

## SAŽETAK

Vinska kiselina ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji se u obliku aditiva (E334) koristi kao regulator kiselosti. Ako se prekomjerno unosi u organizam, može biti štetna za ljudsko zdravlje. U ovom diplomskom radu određena je koncentracija vinske kiseline u komercijalnim uzorcima voćnih nektara i sokova primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, Knauer, Berlin, Njemačka) uz UV/Vis detektor. Korišten je 50 mM fosfatni pufer pH =2,8 kao mobilna faza na koloni obrnute faze (LiChrospher RP-18, 125x4,6 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Njemačka). Validacija metode ispitana je korištenjem standardnih otopina vinske kiseline u rasponu koncentracija od 0,1 g/L do 1,0 g/L. Metoda je bila linearna u ispitivanom području ( $R^2 = 0,9996$ ). Ponovljivost metode iskazana kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je ispod 2%, a srednja preciznost iskazana kao RSD bila je manja od 3%. Granica dokazivanja iznosila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,04 g/L što ukazuje na osjetljivost metode. Vinska kiselina nije detektirana u tri uzorka voćnih nektara, a u četiri uzorka koncentracija je bila u rasponu 0,57 – 3,04 g/L. Razina vinske kiseline u tri prirodna voćna soka bila je u rasponu 3,92 g/L – 4,70 g/L i u skladu je s europskim propisima o dopuštenom dnevnom unosu vinske kiseline. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je potrebno pratiti količinu vinske kiseline u svim prehrambenim proizvodima kako se ne bi prekoračio dopušteni dnevni unos vinske kiseline..

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranica, 6 grafičkih prikaza, 8 tablica i 16 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Vinska kiselina, voćni nektari i sokovi, HPLC, validacija

Mentor: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Suzana Inić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2020.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### DETERMINATION OF TARTARIC ACID IN FRUIT NECTARS AND JUICES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Barbara Hren**

#### SUMMARY

Tartaric acid is widely used in food and pharmaceutical industry. In food industry is used as acidulant and added in products as additive (E334). Higher intake of tartaric acid can be harmful to human health. In this thesis, the concentration of tartaric acid was determined in samples of commercially available fruit nectars and juices by using high performance liquid chromatography (HPLC, Knauer, Berlin, Germany) with UV/Vis detector. It was used 50 mM phosphate buffer pH = 2,8 as mobile phase on reversed phase column (LiChrospher RP-18, 125x4,6 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Germany). Validation of the method was tested with standard tartaric acid solutions in range of concentrations of 0,1 g/L to 1,0 g/L. Method was linear ( $R^2 = 0,9996$ ). The repeatability of the method expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 2 %, and the intermediate precision expressed as RSD was less than 3%. The limit of detection was 0,01 g/L, and the limit of quantification was 0,04 g/L which indicates sensitivity of the method. Tartaric acid was not detected in three samples of fruit nectar, in four samples the concentration of tartaric acid ranged from 0,57 g/L to 3,04 g/L. Level of tartaric acid in three samples of natural fruit juices was in range from 3,92 g/L to 4,70 g/L according to the european regulations of the acceptable daily intake of tartaric acid. From the obtained results it can be concluded that it is important to monitor the concentration of tartaric acid in all food products in order not to exceed the allowable daily intake of tartaric acid.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 6 figures, 8 tables and 16 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Tartaric acid, fruit nectars and juices, HPLC, validation

Mentor: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Suzana Inić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2020.