

# Određivanje limunske kiseline u voćnim sokovima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

---

Ljepović, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:753330>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



**Maja Ljepović**

**Određivanje limunske kiseline u voćnim sokovima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

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

*Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, dr.sc.Suzani Inić, na pruženoj pomoći, strpljenju i ohrabrenju tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

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

*Zahvaljujem svojim roditeljima i braći na mentalnoj i financijskoj potpori tijekom ovih godina studiranja te Josipu na tehničkoj podršci tijekom izrade ovog rada.*

## SADRŽAJ

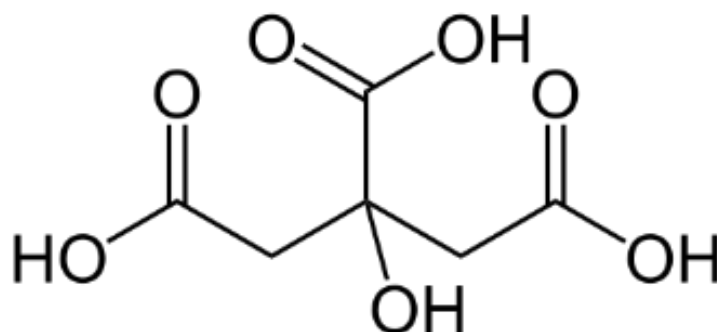
|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 1.1.1. Limunska kiselina.....   | 2  |
| 1.1.2. Upotreba limunske kiseline .....   | 3  |
| 1.1.3. Utjecaj limunske kiseline na ljudsko zdravlje .....                                  | 4  |
| 1.2. Kromatografske metode odjeljivanja .....   | 4  |
| 1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....                          | 5  |
| 1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a .....  | 6  |
| 1.3. Validacija metode.....   | 8  |
| 1.3.1. Selektivnost i specifičnost .....  | 8  |
| 1.3.2. Točnost .....  | 8  |
| 1.3.3. Preciznost.....  | 9  |
| 1.3.4. Otpornost .....  | 9  |
| 1.3.5. Granica dokazivanja i određivanja .....  | 9  |
| 1.3.6. Radno područje i linearnost .....  | 10 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....   | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....   | 13 |
| 3.1. Kemikalije.....  | 14 |
| 3.1.1. Korištene kemikalije: .....  | 14 |
| 3.2. Aparatura .....  | 14 |
| 3.2.1. Upotrebljena aparatura: .....  | 14 |
| 3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC uređaja:.....   | 14 |
| 3.2.3. Uvjeti na HPLC uređaju .....   | 15 |
| 3.3. Uzorci .....   | 15 |
| 3.4. Određivanje koncentracije limunske kiseline HPLC-om .....                              | 15 |
| 3.4.1. Priprema otopina .....   | 15 |
| 3.4.2. Priprema uzoraka .....   | 18 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA.....  | 20 |
| 4.1. Određivanje limunske kiseline na HPLC-u s UV/Vis detektorom .....                      | 21 |
| 4.2. Validacija metode za određivanje limunske kiseline na HPLC-u s UV/Vis detektorom ..... | 22 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.2.1. | Linearnost .....  | 23 |
| 4.2.2. | Preciznost.....   | 24 |
| 4.2.3. | Granica dokazivanja i određivanja .....   | 26 |
| 4.3.   | Primjena validirane metode HPLC s UV/Vis detektorom za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova ..... | 26 |
| 5.     | ZAKLJUČCI.....  | 32 |
| 6.     | LITERATURA.....   | 34 |
| 7.     | SAŽETAK/SUMMARY .....   | 37 |
| 8.     | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .....   | 40 |

# **1.UVOD**

### 1.1.1. Limunska kiselina

Limunska kiselina je slaba organska kiselina ( $pK_a=2,79$ ) većinom prisutna u obliku bezbojnih i bezmirisnih kristala ili bijelog praška. Prema nomenklaturi IUPAC-a ( Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju) nazvana je 2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina. Kemijska struktura limunske kiseline je prikazana na slici 1. Njena molarna masa je 192,123 g/mol. Dobro je topljiva u vodi i etanolu (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).



Slika 1. Kemijska struktura limunske kiseline (<http://www.softschools.com/>)

Limunska kiselina se u farmaceutskoj industriji koristi u obliku anhidrida ili monohidrata. U uzorcima se može dokazati na nekoliko načina. I hidrat i anhidrid citratne kiseline će obojiti otopinu crveno nakon dodatka anhidrida octene kiseline te piridina. Drugi način dokazivanja je neutralizacija s natrijevim hidroksidom tijekom čega dolazi do stvaranja bijelog taloga nakon dodatka kalcijevog klorida i zagrijavanja do vrenja. Anhidrid se još može potvrditi ispitivanjem tališta koje iznosi 153°C (Grdinić, 2011).

Limunsku kiselinu je moguće odrediti voltametrijskom metodom koristeći ugljikovu elektrodu koja je modificirana s kobaltovim ftalocijaninom. Ova metoda omogućuje jeftino, brzo i osjetljivo određivanje organskih kiselina u voćnim sokovima bez prethodne obrade uzoraka. Osim limunske, na ovaj način moguće je odrediti i malonsku, mliječnu i vinsku kiselinu (Silva i sur.,2018).

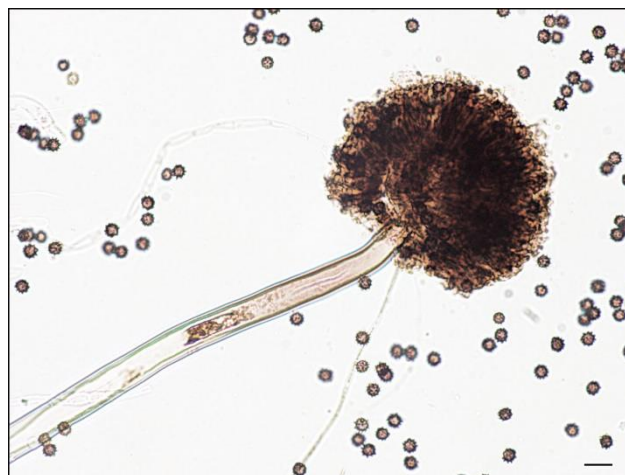
Soli limunske kiseline se nazivaju citrati i u takvom obliku se nalaze u ljudskim stanicama te sudjeluju u procesu proizvodnje ATP-a. Prvotno iz glukoze, procesom glikolize, nastaje piruvat koji se zatim prenosi u mitohondrij gdje služi za acetilaciju koenzima A. Nastali acetil-CoA zatim ulazi u ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus gdje sudjeluje u nastanku citrata iz oksaloacetata. Zatim slijedi niz oksidacija što rezultira dobivanjem NADH

i FADH<sub>2</sub> iz kojih se dobiva ATP procesom oksidativne fosforilacije. Iz citrata se preko niza spojeva ponovno dobiva oksaloacetat koji je spreman za sljedeći ciklus. Također, iz citrata nastali acetyl-CoA sudjeluje u sintezi masnih kiselina (Cooper i Hausman, 2010).

Citrati se u Europskoj farmakopeji identificiraju u približno deset monografija, reakcijom koja je nazvana Legalova. Primarno, citrati se oksidiraju i dekarboksiliraju dodatkom kalijeva permanganata uz zagrijavanje. Tako nastali aceton reagira s nitrozo skupinom iz natrijeva nitroprusida prilikom čega dolazi do redukcije željeza i nastaje ljubičasto-plavo obojenje u lužnatoj sredini (Grdinić, 2011).

### 1.1.2. Upotreba limunske kiseline

Citratna kiselina ima široku upotrebu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Koristi se u proizvodnji voćnih sokova, sladoleda i slatkiša. Također, sprječava tamnjenje voća i povrća, pa se koristi i kao sinergijska komponenta antioksidansa te kao pojačivač arome u mliječnim proizvodima. Za njeno dobivanje se koristi gljivica *Aspergillus niger* koji fermentira melasu uz nastajanje limunske kiseline (slika 2) (Belitz i sur., 2009).



Slika 2. *Aspergillus niger* (<https://www.inspq.qc.ca/>)



### **1.1.3. Utjecaj limunske kiseline na ljudsko zdravlje**

Zbog široke upotrebe limunske kiseline u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, važno je razmotriti njen utjecaj na ljudsko zdravlje. U tu svrhu, provedene su različite studije. Dokazano je da izloženost limunskoj kiselini uzrokuje napadaje kašlja kod gvineja svinja. Višestruko izlaganje svinja limunskoj kiselini dovodi do zadebljanja glatkih mišića perifernih dišnih putova te trahealne bazalne membrane što dovodi do povećanja frekvencije kašlja. Potvrđen je sličan odgovor i kod ljudi (Belvisi i sur., 2006; Cui i sur., 2019).

Nadalje, dokazana je erozija zuba i zubne cakline kao i smanjenje površinske tvrdoće konzumacijom limunske kiseline. Isto tako, studije pokazuju utjecaj limunske kiseline na promjenu sastava sline, značajno više kod žena nego kod muškaraca (Li-Hui i sur., 2016; Zheng i sur., 2011; Dündar i sur., 2018).

Unošenjem limunske kiseline u organizam svinje dolazi do povećane apsorpcije kalcija, fosfora i proteina te se povećava njihova koncentracija u plazmi. Također, dolazi do pojačanog humoralnog odgovora te se povećava koncentracija imunoglobulina u mlijeku svinje. Ingestija vrlo visokih doza limunske kiseline kod ljudi može izazivati metaboličku acidozu, hiperkalijemiju te nagli nastup hipotenzije te je kao takva ugrožavajuća za život (Liu i sur., 2014; DeMars i sur., 2001).

Nadalje, infuzija limunske kiseline uzrokuje snižavanje pH i koncentracije bikarbonata i kalcija u plazmi. Isto tako, produljuje vrijeme zgrušavanja krvi te povećava izlučivanje ugljičnog dioksida (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

## **1.2. Kromatografske metode odjeljivanja**

Kromatografskim metodama je omogućeno odjeljivanje te dokazivanje i određivanje sastavnica iz smjese. Moguće je analizirati vrlo slične spojeve, kao i spojeve vrlo niskih koncentracija, stoga su te tehnike jedne od najkorištenijih u današnje vrijeme. Sve vrste kromatografskih metoda karakterizira postojanje mobilne i stacionarne faze. Sastojci uzorka su nošeni mobilnom fazom preko stacionarne faze tijekom čega dolazi do odjeljivanja sastavnica uzorka. Odjeljivanje se temelji na različitim brzinama kretanja komponenata zbog njihovih različitih interakcija s česticama stacionarne faze. Pokretna faza može biti tekućina,

plin ili superkritični fluid, dok je nepokretna faza krutina ili tekućina na čvrstom nosaču (stacionarna tekućina) (Luterotti, 2014; Skoog i sur.,1999).

Postoje dvije vrste kromatografskih metoda prema tehnici izvođenja: kolonska i plošna. Kod kromatografije na stupcu (koloni), stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju prolazi mobilna faza djelovanjem tlaka ili sile gravitacije. U plošnoj kromatografiji stacionarna faza se nalazi na ravnoj plohi, dok mobilna prolazi njome pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije (Skoog i sur.,1999; Fifield i Kealey, 2000).

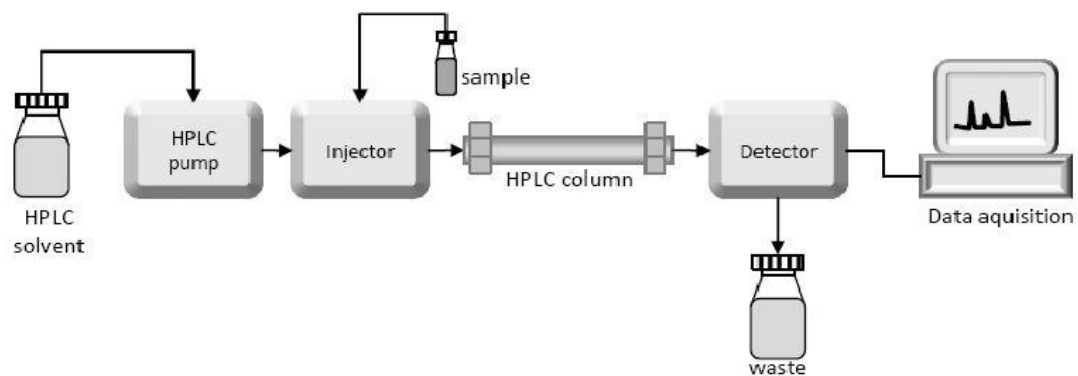
### **1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*) je najčešće korištena tekućinska kromatografija. S obzirom na mehanizam odjeljivanja tekućinska kromatografija može biti adsorpcijska, razdjelna, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna te prema veličini čestica. HPLC je tekućinska razdjelna kromatografija koja se koristi za odjeljivanje i određivanje analita u različitim uzorcima. U ovoj se kromatografskoj tehnici kao mobilna faza koristi tekućina, većinom smjesa otapala čija se svojstva prilagođavaju kako bi se postiglo što bolje odjeljivanje. Metoda se zasniva na protoku mobilne faze, pod tlakom, kroz stacionarnu fazu koju čini stacionarna tekućina vezana na čestice krutog nosača, promjera 3-10  $\mu\text{m}$ . Tlak mora biti iznimno velik, reda veličine  $10^6$  Pa, kako bi se postigao protok od 10 mL/min. Zbog različitih interakcija sastavnica s česticama mobilne faze, komponente uzorka imaju različito vrijeme zadržavanja te tijekom njihovog prolaza kroz kolonu dolazi do odjeljivanja (Luterotti, 2014; Watson 2012).

S obzirom na relativnu polarnost stacionarne i mobilne faze, razlikujemo dvije vrste tekućinske kromatografije. Normalno faznu kromatografiju karakterizira vrlo polarna stacionarna faza, dok je mobilna relativno nepolarna. Kod obrnuto fazne kromatografije, stacionarna faza je nepolarna, dok je mobilna faza relativno polarno otapalo, primjerice voda, metanol ili acetonitril. Kao stacionarna faza se najčešće koristi modificirani silika gel ovisno o vrsti kromatografije. Kod normalno fazne najčešće su na njega vezane različite polarne skupine, primjerice hidroksilna, dok se kod obrnuto fazne na površini silika gel nalazi neki nepolarni ugljikovodik, primjerice, oktadecilsilil (ODS). Tako će se kod normalno fazne

kromatografije prvo eluirati lipofilniji sastojci, dok kod obrnuto fazne polarniji zbog slabije interakcije s česticama stacionarne faze. Na redosljed eluacije utječe i polarnost same mobilne faze (Skoog i sur., 1999; Watson, 2012).

Nakon pripreme mobilne faze potrebno je iz nje ukloniti plinove i čvrste čestice kako ne bi došlo do oštećenja uređaja. Suvremeni HPLC uređaji često sadrže takvu opremu za uklanjanje plinova i čvrstih čestica unutar spremnika za mobilnu fazu. Nakon obrade, otapalo se pumpa pod visokim tlakom u kolonu. Sam uzorak se unosi mikrolitarskom špricom u petlju. Otapalo prolazi kroz petlju te ulazi zajedno s uzorkom na kolonu. U koloni dolazi do razdvajanja sastojaka uzorka te oni u različitom vremenu stižu na detektor. Odziv detektora se bilježi kao funkcija vremena ili kao funkcija volumena mobilne faze. Takav prikaz nazivamo kromatogram. Položaj samog pika (eluacijska krivulja) može poslužiti za identifikaciju analita, dok iz površine ili visine pika možemo odrediti njegovu koncentraciju (slika 3) (Luterotti, 2014; Skoog i sur.,1999).



Slika 3. Shematski prikaz osnovnih dijelova HPLC uređaja  
(<https://laboratoryinfo.com/hplc/>)

### 1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a

#### 1. Spremnik mobilne faze i sustav za obradu otapala

Mobilna faza se nalazi u čeličnim ili staklenim spremnicima, volumena najmanje 500 mL. Često se, kod suvremenih HPLC uređaja, u sklopu spremnika nalazi oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz otapala. Plinovi mogu uzrokovati širenje zona pikova, dok čvrste čestice ometaju rad detektora, stoga ih valja ukloniti.

## 2. Pumpe

Pumpe koje se koriste u HPLC uređajima, trebale bi stvarati tlak do 40 milijuna Pa, pri čemu nastaje protok od 0,1 do 10 mL/min, uz reproducibilnost protoka od 99,5 %. Prilikom protoka mobilne faze, ne bi smjelo doći do pulsiranja zraka ili korozije uzrokovane različitim otapalima. Za primjenu u tekućinskoj kromatografiji koriste se dvije vrste mehaničkih pumpi. Pumpa na vijčani pogon ima mali kapacitet pa se češće koristi recipročna crpka. Recipročne pumpe se sastoje od komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa. Pogodne su za gradijentnu eluciju jer protok ne ovisi o viskoznosti otapala. U neke uređaje ugrađene su i pneumatičke pumpe. One su jednostavne i jeftine, ali također imaju mali kapacitet (Skoog i sur., 1999).

## 3. Sustav za injektiranje uzorka

Postoje manualni i nekoliko vrsta automatskih sustava za injektiranje uzorka. Analizirani uzorak se injektira u petlju manualnog injektora te se pomicanjem ručice prenosi u kolonu nošen mobilnom fazom. Takvi injektori se mogu koristiti za injektiranje različitih volumena uzorka. Automatski injektori su programirani tako da unesu niz istih volumena uzoraka. Na takav način se lakše može odrediti preciznost i točnost metode te omogućavaju jeftiniju i bržu analizu (Venn, 2000).

## 4. Kolone za HPLC

Kolone koje se najčešće koriste u visoko djelotvornoj tekućinskoj kromatografiji su obično izrađene od čelika, iako se ponekad kod nižih tlakova koriste staklene cijevi debljih stjenki. Dužine su otprilike 10 – 30 cm, a unutarnji promjer iznosi 4 –10 mm. Promjer samih zrna punila su najčešće od 5 do 10  $\mu\text{m}$ . U novije vrijeme, koriste se mikrokolone čija je duljina od 3 do 7,5 cm te unutrašnjeg promjera od 1 do 4,6 mm. Takve kolone su punjene zrcima promjera 3 –5  $\mu\text{m}$ . One su bolje jer troše manje otapala, a sama analiza je kraća (Skoog i sur., 1999).

## 5. Detektori

Za većinu analiza koristi se UV/Vis detektor s varijabilnom valnom duljinom. Ukoliko analit ne sadrži dobar kromofor ili je dio kompleksnog uzorka čija matrica može uzrokovati interferencije s analitom radije se koriste neki drugi oblici detektora. Primjerice, koriste se još

fluorescencijski i elektrokemijski detektori, detektori koji mjere indeks loma ili vodljivost, maseni detektori itd. (Watson, 2012).

### 1.3. Validacija metode

Validacija analitičke metode se provodi s ciljem dokazivanja prikladnosti analitičkog postupka za svrhu za koju je namijenjena. Izvodi se pri razvoju nove metode ali i pri bilo kakvoj promjeni već validirane metode. Parametri koji se ispituju prilikom validacije su: preciznost, specifičnost/selektivnost, točnost, otpornost, granica dokazivanja i određivanja te radno područje i linearnost. Određivanje parametara uvjetovano je namjenom analitičke metode.

#### 1.3.1. Selektivnost i specifičnost

Specifičnost metode je sposobnost te metode da izmjeri samo jedan analit u prisutnosti drugih sastavnica uzorka bez ikakve dvojbe. U praksi je češći pojam selektivnost koji se odnosi na sposobnost metode da točno odredi analit u prisutnosti matrice uzorka, odnosno onečišćenja, pomoćnih tvari ili razgradnih produkata (Nigović i sur.,2014).

#### 1.3.2. Točnost

Točnost analitičkog postupka prikazuje podudaranje između srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Dakle, točnost metode je razlika u koncentracijama analita u uzorcima u kojima je otprije utvrđena koncentracija te uzorcima nepoznatih koncentracija. Točnost se utvrđuje uz najmanje tri ponovljena mjerenja uzorka na najmanje tri različite koncentracije unutar radnog područja. Najčešće se izražava kao analitički prinos (engl. *recovery*)

$$R = \frac{\bar{x}}{\hat{x}} \times 100,$$

gdje je  $\bar{x}$  izmjerena srednja vrijednost, dok je  $\hat{x}$  stvarna vrijednost analita (Nigović i sur., 2014; Ahuja i Scypinski, 2011).

### 1.3.3. Preciznost

Preciznost analitičke metode iskazuje podudaranje između niza ponovljenih mjerenja različitih alikvota istog uzorka pri propisanim uvjetima. Može se izraziti kao ponovljivost (engl. *repeatability*), srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) ili obnovljivost (engl. *reproducibility*). Ponovljivost označava slaganje rezultata dobivenih u kratkom vremenskom intervalu pri istim uvjetima (isti laboratorij, isti instrument). Srednja preciznost označava odstupanje rezultata dobivenih u različitim uvjetima u istom laboratoriju (različiti instrument, različiti analitičari) kroz dulje vremensko razdoblje. Obnovljivost označava odstupanje dobiveno u različitim laboratorijima. Najčešće se preciznost dobiva s pet do šest mjerenja na minimalno dvije različite koncentracije, a iskazuje se kao relativno standardno odstupanje (Nigović i sur., 2014; Valcarcel, 2000).

### 1.3.4. Otpornost

Otpornost analitičke metode je mjera sposobnosti metode da ostane nepromijenjena, pod utjecajem malih ali namjernih promjena parametara metode. Otpornost nam omogućava indiciju pouzdanosti metode tijekom njezine normalne upotrebe (Ahuja i Scypinski, 2011).

### 1.3.5. Granica dokazivanja i određivanja

Granica dokazivanja (engl. LOD, *limit of detection*) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti, dok je granica određivanja (engl. LOQ, *limit of quantification*) najmanja koncentracija analita koja se može dokazati s odgovarajućom preciznošću i točnošću. Dobivaju se postupnim razrjeđenjem ispitivane otopine ili iz kalibracijske krivulje, prema formulama:

$$\text{LOD} = \frac{3,3x\sigma}{a}, \text{ LOQ} = \frac{10x\sigma}{a},$$

gdje je  $\sigma$  standardno odstupanje regresijskog pravca odnosno standardno odstupanje odsječka na osi y, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

### **1.3.6. Radno područje i linearnost**

Linearnost analitičke metode je njena sposobnost da unutar određenog intervala dobije linearnu ovisnost analitičkog signala o koncentraciji analita u uzorku. Određuje se mjerenjem tri do šest puta primjenom nekoliko različitih koncentracija analita. Zatim se napravi kalibracijska krivulja ovisnosti analitičkog signala o samoj koncentraciji analita. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca te bi trebala iznositi  $R^2 > 0,999$ .

Radno područje analitičkog postupka je interval između gornje i donje koncentracije analita (uključujući i te dvije) za koje je dokazano da je analitička metoda adekvatne preciznosti, točnosti i linearnosti (Ahuja i Scypinski, 2011; Nigović i sur., 2014).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Limunska kiselina je organska kiselina najčešće prisutna u obliku anhidrida ili monohidrata. U ljudskom organizmu je prisutna u obliku citrata te u takvom obliku sudjeluje u procesu ciklusa limunske kiseline važnog za dobivanje energije u ljudskom tijelu. Za industrijsku upotrebu se dobiva fermentacijom melase pomoću gljivice *Aspergillus niger*.

Limunska kiselina se često koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao antioksidans i regulator kiselosti. Nekim istraživanjima je pokazano da je u višim koncentracijama štetna za ljudsko zdravlje. Dokazano je da izaziva kašalj, utječe na promjenu sastava sline te uzrokuje eroziju zubne cakline. Može utjecati i na zgrušavanje krvi, a ingestija vrlo visokih koncentracija može dovesti do metaboličke acidoze, hiperkalijemije te može biti ugrožavajuća za život. Zbog tih razloga je važno kontrolirati razinu limunske kiseline u proizvodima koji se koriste za prehranu ljudi.

Cilj ovog istraživanja je odrediti limunsku kiselinu u različitim uzorcima prirodnih i komercijalnih voćnih sokova primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV/Vis detektorom. Prije samog određivanja metodu je potrebno validirati ispitivanjem validacijskih parametara: linearnosti, preciznosti (ponovljivost i srednja preciznost), granice dokazivanja i granice određivanja.

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

### **3.1. Kemikalije**

#### **3.1.1. Korištene kemikalije:**

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

Sve korištene kemikalije su bile *p.a.* čistoće, dok je metanol korišten za kondicioniranje HPLC uređaja bio HPLC čistoće. Za pripremanje otopina upotrebljena je ultračista voda.

### **3.2. Aparatura**

#### **3.2.1. Upotrebljena aparatura:**

1. analitička vaga, Acculab, Satorius group, Bradford, SAD
2. HPLC uređaj, Knauer, Berlin, Njemačka
3. pH metar, MP220, Mettler Toledo, Švicarska
4. ultrazvučna kupelj, Transsonic T570, Elma, Singen, Njemačka
5. filter papir, Munktell 110mm/388, Njemačka
6. jednokratni filter, Minisart RC 25, vel. pora 0.45 µm, Sartorius Stedim, Goettingen, Njemačka

#### **3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC uređaja:**

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

### **3.2.3. Uvjeti na HPLC uređaju**

Prije početka, kao i na kraju rada HPLC uređaj je kondicioniran s 50% otopinom metanola iz koje je prije korištenja uklonjen zrak na ultrazvučnoj kupelji. Proces uklanjanja zraka trajao je dvaput po 15 minuta kako bi bili sigurni da je sav zrak uklonjen. Na isti način zrak je uklonjen i iz mobilne faze.

Za mobilnu fazu korištena je 50mM otopina fosfatnog pufera koja je pripravljena otapanjem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u ultračistoj vodi, te prilagodbom pH do 2,8 pomoću  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Protok mobilne faze iznosio je 0,5 mL/min. Volumen standardnih otopina limunske kiseline, kao i svakog injektiranog uzorka iznosio je 50  $\mu\text{L}$ . Valna duljina UV/Vis detektora je iznosila 214 nm, a detektirani podatci su obrađeni pomoću softvera Eurochrome 2000 Software.

### **3.3.Uzorci**

Za analizu je uzeto petnaest uzoraka voćnih sokova, od čega je devet uzoraka deklariranih kao prirodni voćni sokovi te šest komercijalnih voćnih sokova pribavljenih u trgovini. Sokovi su bili različitih proizvođača te različitog sastava. Analizirano je ukupno šest sokova od jabuke, dva od višnje i naranče, jedan od limuna s marakujom, te četiri od različitih vrsta voća od kojih je u tri bila prisutna i mrkva.

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

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

##### **1. Mobilna faza**

Za mobilnu fazu korištena je 50 mM otopina fosfatnog pufera. Za pripremu 1,00 L toga pufera potrebno je izvagati 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M=136,09$ ). Za vaganje je korištena analitička vaga, te je odvaga kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 1000,00 mL. Nakon otapanja limunske kiseline pH otopine je podešen dodatkom 85%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na 2,8. Zatim je otopina nadopunjena do volumena 1,00 L ultračistom vodom. Takav kisel

pH je potreban da bi limunska kiselina ostala protonirana i ostvarila bolju interakciju s C18 stacionarnom fazom. Na kraju, mobilna faza je stavljena u ultrazvučnu kupelj, dva puta po petnaest minuta da bi se uklonio zrak koji potencijalno može oštetiti HPLC uređaj.

## 2. Matična otopina limunske kiseline

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

## 3. Standardne otopine limunske kiseline

Iz matične otopine limunske kiseline pripravljeno je niz standardnih otopina u koncentracijskom rasponu od 0,125 g/L do 1 g/L. Standardne otopine limunske kiseline su pripravljene razrjeđivanjem matične otopine s ultračistom vodom (tablica 1). Tako pripravljene otopine su injektirane u HPLC uređaj.

Tablica 1. Postupak izrade standardnih otopina limunske kiseline razrjeđenjem

| <b>Koncentracija standardne otopine limunske kiseline (g/L)</b> | <b>Postupak pripreme standardnih otopina limunske kiseline</b>  | <b>Ukupno razrjeđenje matične otopine limunske kiseline</b> |
|---|---|---|
| 1,0   | 5000 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom | 2x  |
| 0,75  | 3750 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom | 2,6x  |
| 0,5   | 2500 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom | 4x  |
| 0,25  | 1250 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom | 8x  |
| 0,125   | 625 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom  | 16x   |
| 0,1   | 500 $\mu$ L standardne otopine limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno je do 10 mL s ultračistom vodom  | 20x   |

### 3.4.2. Priprema uzoraka

Uzorci voćnih sokova su pripremljeni razrjeđivanjem s ultračistom vodom u omjeru 1:9 u odmjernim tikvicama od 10,00 mL. U tablici 2 je prikazan postupak pripreme ispitivanih uzoraka prirodnih voćnih sokova, dok je u tablici 3 opisan postupak razrjeđenja komercijalno pribavljenih sokova. Neki od sokova su sadržavali talog ili zamućenje stoga je takve sokove bilo potrebno najprije profiltrirati pomoću filter papira da bi se uklonile veće čestice taloga, a zatim i kroz jednokratni filter pora veličine 0,45 µm, koristeći špricu kako bi uklonili i sitnije čestice taloga. Nakon razrjeđenja, takvi uzorci su injektirani u HPLC uređaj.

Tablica 2. Uzorci prirodnih voćnih sokova i postupak razrjeđenja

| <b>Uzorci prirodnih voćnih sokova</b>    | <b>Postupak razrjeđenja ultračistom vodom</b>              |
|--|--|
| Uzorak 1, sok od jabuke                  | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 2, sok od višnje                  | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 3, sok od limuna s marakujom      | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 4, sok od jabuke                  | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 5, sok od jabuke                  | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 6, sok od naranče                 | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 7, sok od miješanog voća s mrkvom | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 8, sok od naranče, limuna i mrkve | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 9, sok od naranče, limuna i mrkve | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |

Tablica 3. Uzorci komercijalnih voćnih sokova i postupak razrjeđenja

| Uzorci komercijalnih voćnih sokova | Postupak razrjeđenja deioniziranom vodom                   |
|------------------------------------|--|
| Uzorak 1, sok od miješanog voća    | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 2, sok od jabuke            | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 3, sok od višnje            | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 4, sok od naranče           | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 5, sok od jabuke            | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |
| Uzorak 6, sok od jabuke            | 1 mL uzorka soka je nadopunjeno do 10 mL ultračistom vodom |



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

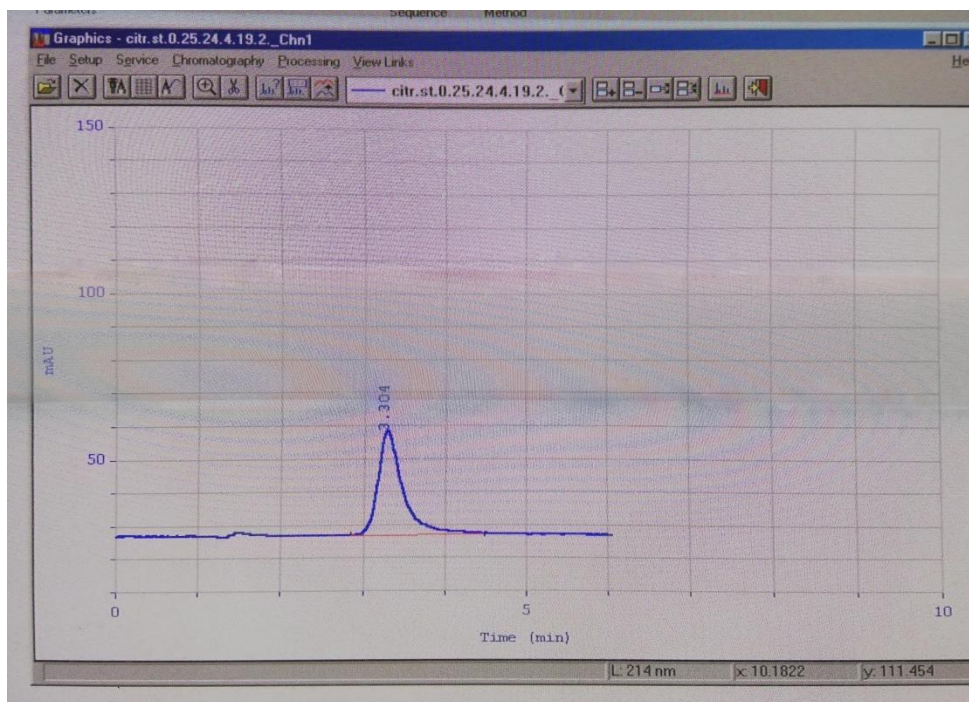
#### 4.1. Određivanje limunske kiseline na HPLC-u s UV/Vis detektorom

U ovome istraživanju za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima korištena je HPLC metoda obrnute faze s UV/Vis detektorom. Prema literaturnim podacima valna duljina detekcije limunske kiseline pomoću UV/Vis detektora je 214 nm, te je UV/Vis detektor podešen na 214 nm (Weikle, 2012).

Mobilna faza je bila 50 mM otopina fosfatnog pufera, podešena na pH = 2,8 i pripravljena kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode. Budući da je limunska kiselina slaba organska kiselina male molarne mase ( $M = 192,123 \text{ g/mol}$ ) i ima polarne skupine, potrebna je 100% vodena mobilna faza kako bi se postiglo odgovarajuće zadržavanje na koloni. pH mobilne faze podešen je na 2,8 kako bi limunska kiselina ostala protonirana ili neutralna, čime se ostvaruje najbolja interakcija s C18 stacionarnom fazom kromatografske kolone (Kowalski i Wittrig, 2007). Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa.

U ovim analitičkim uvjetima (kolona obrnute faze, C18, dimenzija 125,0 x 4,6 mm, veličina punila 5  $\mu\text{m}$ ; valna duljina detektora, 214 nm i mobilna faza 50 mM fosfatni pufer pH 2,8, protok 0,5 ml/min) dobiven je zadovoljavajući kromatogram osnovne (bazne) linije, odnosno bez interferencija.

Na slici 4. prikazan je kromatogram standardne otopine limunske kiseline koncentracije 0,25 g/L dobiveni pri istim uvjetima mjerenja. Iz prikazanog kromatograma vidljivo je da je vrijeme zadržavanja standarda limunske kiseline na koloni iznosilo oko 3 minute dok je ukupna analiza trajala otprilike 6 minuta. Na osnovu vremena zadržavanja limunske kiseline na koloni, 3 minute, i ukupne analize, 6 minuta, može se zaključiti da je metoda u ovim uvjetima brza.



Slika 4. Kromatogram dobiven analizom standardne otopine limunske kiseline koncentracije 0,25 g/L

#### 4.2. Validacija metode za određivanje limunske kiseline na HPLC-u s UV/Vis detektorom

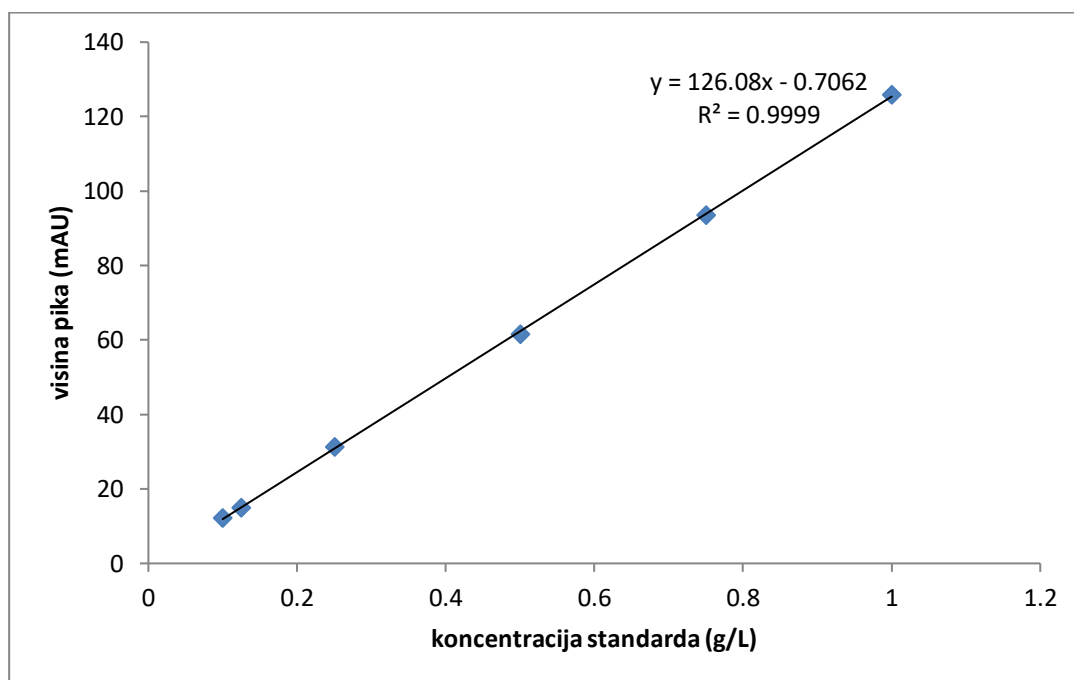
Validacijom analitičke metode se utvrđuje njezina prikladnost za ispitivanje za koje je namijenjena, odnosno validacijom se dokazuje da će se korištenjem odabrane analitičke metode dobiti ispravni rezultati. Validacija analitičkog postupka je obvezna, a koji parametri će se ispitivati prilikom validacije ovisi o samoj namjeni metode (Nigović i sur., 2014).

Prije određivanja limunske kiseline u voćnim sokovima, već razvijena metoda je validirana. Za validaciju metode korištene su standardne otopine limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,1 g/L do 1,0 g/L. Priprema standardnih otopina limunske kiseline opisana je u poglavlju Materijali i metode. U svrhu validacije metode ispitani su validacijski parametri: linearnost, preciznost (ponovljivost i srednja preciznost), granica dokazivanja i granica određivanja.

### 4.2.1. Linearnost

Linearnost analitičkog postupka je sposobnost tog postupka da unutar nekog određenog intervala daje rezultate koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Utvrđuje se sa tri do šest mjerenja na pet različitih koncentracija analita. Kalibracijska krivulja prikazuje ovisnost analitičkog signala o koncentraciji analita te se sama linearnost izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca,  $R^2$  koji bi trebao biti veći od 0,999 (Nigović i sur., 2014).

U svrhu izrade kalibracijskog pravca i provjere linearnosti metode, izrađen je niz standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,1 g/L do 1,0 g/L. Te standardne otopine su analizirane četiri puta te je za svaku koncentraciju izračunata srednja vrijednost odgovora detektora, odnosno visina pika. Koristeći taj podatak zajedno s poznatim koncentracijama standardnih otopina konstruiran je kalibracijski pravac prikazan na slici 5. Zatim je regresijskom analizom dobivena jednačba pravca  $y = 126,08x - 0,7062$  te pripadajući koeficijent korelacije  $R^2 = 0,9999$ .



Slika 5. Kalibracijski pravac standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu 0,1 – 1,0 g/L

Iz dobivene jednadžbe pravca i koeficijenta korelacije može se zaključiti da je metoda u koncentracijskom rasponu 0,1 g/L do 1,0 g/L linearna te se može primijeniti za određivanje sadržaja limunske kiseline.

#### 4.2.2. Preciznost

Preciznost analitičke metode iskazuje podudaranje između niza ponovljenih mjerenja različitih alikvota istog uzorka pri propisanim uvjetima. Može se izraziti kao ponovljivost srednja preciznost ili obnovljivost. Ponovljivost označava slaganje rezultata dobivenih u kratkom vremenskom intervalu pri istim uvjetima (Valcarcel, 2000; Nigović i sur., 2014).

Tijekom ispitivanja ponovljivosti analizirane su standardne otopine limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,1 g/L do 1 g/L koje su nekoliko puta uzastopno injektirane u HPLC. Zatim je iz dobivenih vrijednosti visine pikova izračunata relativna standardna devijacija. U tablici 4 su prikazani dobiveni rezultati za standardnu otopinu koncentracije 1g/L.

Tablica 4. Rezultati mjerenja visine pikova standarda limunske kiseline koncentracije 1g/L u kratkom vremenskom intervalu

| Standard koncentracije 1g/L             | Visina pika (mAU) |
|---|-------------------|
| 1.mjerenje                              | 125,178           |
| 2.mjerenje                              | 124,327           |
| 3.mjerenje                              | 126,241           |
| 4.mjerenje                              | 127,51            |
| 5.mjerenje                              | 126,2             |
| Srednja vrijednost visine pika (X)      | 125,89            |
| Standardna devijacija (SD)              | 1,2035            |
| Relativna standardna devijacija (RSD/%) | 0,956             |

Na jednak način izračunate su relativne standardne devijacije za preostale standarde limunske kiseline (tablica 5).

Tablica 5. Rezultati ponovljivosti dobiveni ispitivanjem standardnih otopina limunske kiseline koncentracija 0,1 g/L, 0,125 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L

| <b>Koncentracija standarda limunske kiseline<br/>(g/L)</b> | <b>RSD (%)</b> |
|--|----------------|
| 0,1  | 0,980          |
| 0,125  | 0,529          |
| 0,25   | 0,520          |
| 0,5  | 2,012          |
| 0,75   | 1,679          |

Sve dobivene RSD vrijednosti su manje od 2,5%, stoga se može zaključiti da je ova metoda za određivanje koncentracije limunske kiseline precizna.

U svrhu validacije metode ispitana je i srednja preciznost odnosno ponovljivost unutar duljeg vremenskog intervala, tako da je izmjeren odaziv detektora na tri različite koncentracije standardnih otopina unutar tri različita dana. Svaka otopina je mjerena više puta te je izračunata srednja vrijednost kao i RSD (tablica 6).

Tablica 6. Srednja preciznost dobivena ponovljenim mjerenjem standardnih otopina limunske kiseline na tri koncentracijske razine (0,125 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L) u tri uzastopna dana

| <b>Koncentracija standarda limunske kiseline<br/>(g/L)</b> | <b>RSD(%)</b> |
|--|---------------|
| 0,125  | 2,609         |
| 0,5  | 1,656         |
| 0,75   | 1,574         |

Iz dobivenih RSD vrijednosti uočeno je da nijedna vrijednost nije veća od 3%, pa se može zaključiti da je ispitivana metoda prikladna za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorku.

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

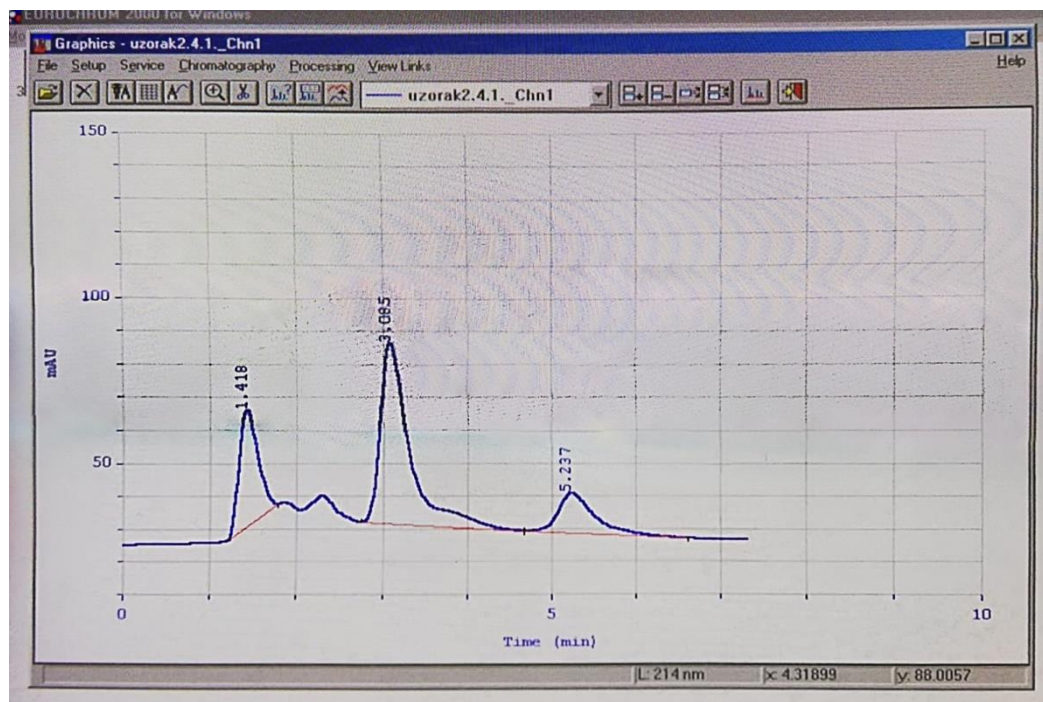
LOD odnosno granica dokazivanja, je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati, ali ne i odrediti, dok je LOQ ili granica određivanja najmanja koncentracija analita koja se može dokazati s odgovarajućom preciznošću i točnošću (Nigović i sur., 2014).

LOD i LOQ su izračunati iz nagiba kalibracijskog pravca. Granica dokazivanja iznosi 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L. Dobiveni podatci nam ukazuju da je metoda dovoljno osjetljiva te da se u nepoznatom uzorku može pouzdano odrediti koncentracija limunske kiseline od 0,03g/L.

### **4.3.Primjena validirane metode HPLC s UV/Vis detektorom za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova**

Uzorci voćnih sokova pripremljeni su kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, nakon čega su injektirani u kolonu te analizirani HPLC-om. Detekcija je provedena s UV/Vis detektorom.

U većini analiziranih uzoraka došlo je do pojave više analitičkih signala koji odgovaraju drugim sastavnicama uzorka (slika 6). Vrijeme zadržavanja standardne otopine limunske kiseline iznosi oko 3 minute pa je usporedbom vremena zadržavanja standarda limunske kiseline i vremena zadržavanja sastavnica uzorka soka utvrđeno koji pik u uzorku voćnog soka odgovara pik standarda limunske kiseline.



Slika 6. Kromatogram dobiven analizom komercijalnog soka od naranče (uzorak 4)

Mjerenje svakog uzorka provedeno je višestruko te je izračunata srednja vrijednost visine pika za svaki uzorak. Koncentracija limunske kiseline u uzorcima je izračunata iz dobivene srednje vrijednosti uvrštene u jednadžbu kalibracijskog pravca, a rezultati su prikazani u tablici 7 i 8.



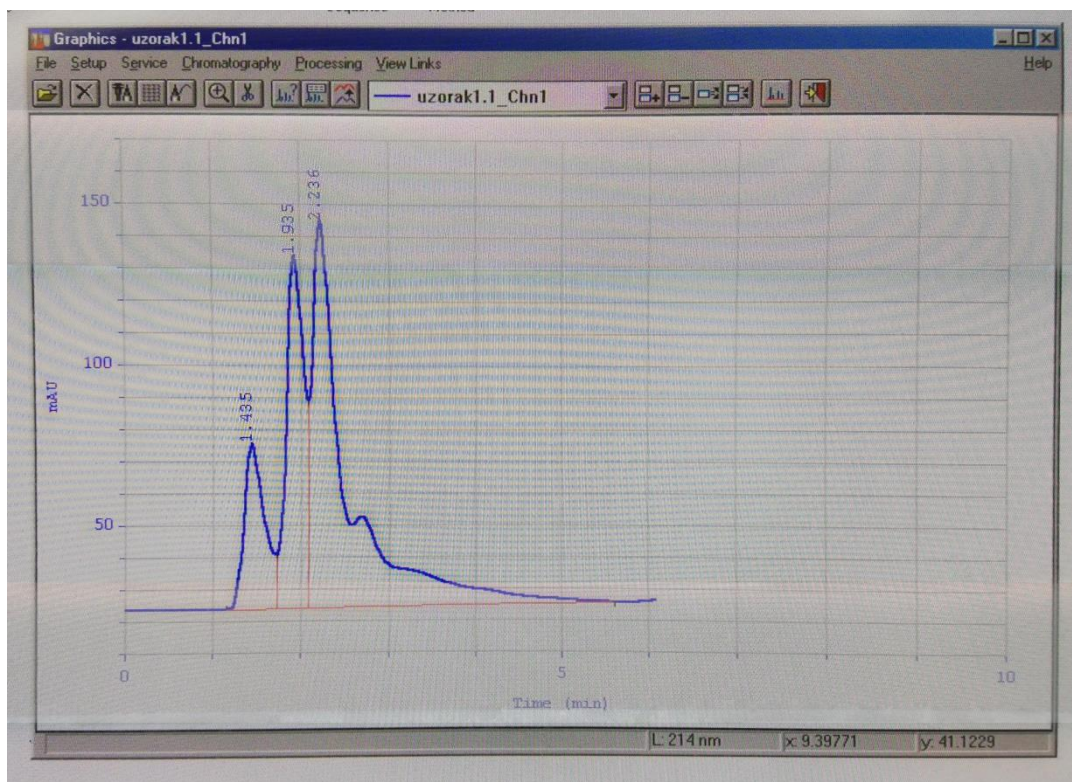
Tablica 7. Visina pikova i koncentracija limunske kiseline u uzorcima prirodnih voćnih sokova

| <b>Uzorci prirodnih voćnih sokova</b>    | <b>Visina pika (mAU)</b> | <b>Koncentracija limunske kiseline u analiziranim razrijeđenim uzorcima (g/L)</b> | <b>Koncentracija limunske kiseline u voćnim sokovima (g/L)</b> |
|--|--------------------------|---|--|
| Uzorak 1, sok od jabuke                  | 0                        | 0   | 0  |
| Uzorak 2, sok od višnje                  | 0                        | 0   | 0  |
| Uzorak 3, sok od limuna s marakujom      | 52,33                    | 0,421   | 4,21   |
| Uzorak 4, sok od jabuke                  | 0                        | 0   | 0  |
| Uzorak 5, sok od jabuke                  | 0                        | 0   | 0  |
| Uzorak 6, sok od naranče                 | 95,83                    | 0,7657  | 7,657  |
| Uzorak 7, sok od miješanog voća s mrkvom | 39,02                    | 0,3151  | 3,151  |
| Uzorak 8, sok od naranče, limuna i mrkve | 59,09                    | 0,4742  | 4,742  |
| Uzorak 9, sok od naranče, limuna i mrkve | 68,67                    | 0,5503  | 5,503  |

Tablica 8. Visina pikova i koncentracija limunske kiseline u uzorcima komercijalnih voćnih sokova

| <b>Uzorci komercijalnih voćnih sokova</b> | <b>Visina pika (mAU)</b> | <b>Koncentracija limunske kiseline u analiziranim razrijeđenim uzorcima (g/L)</b> | <b>Koncentracija limunske kiseline u voćnim sokovima (g/L)</b> |
|---|--------------------------|---|--|
| Uzorak 1, sok od miješanog voća           | 17,18                    | 0,1419  | 1,419  |
| Uzorak 2, sok od jabuke                   | 35,14                    | 0,2843  | 2,843  |
| Uzorak 3, sok od višnje                   | 48,21                    | 0,388   | 3,88   |
| Uzorak 4, sok od naranče                  | 55,03                    | 0,4421  | 4,421  |
| Uzorak 5, sok od jabuke                   | 30,80                    | 0,2499  | 2,499  |
| Uzorak 6, sok od jabuke                   | 29,77                    | 0,2417  | 2,417  |

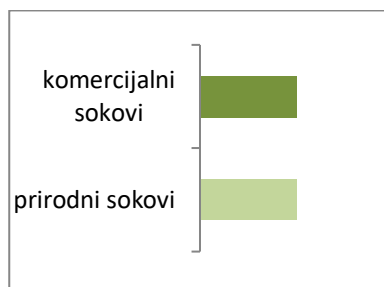
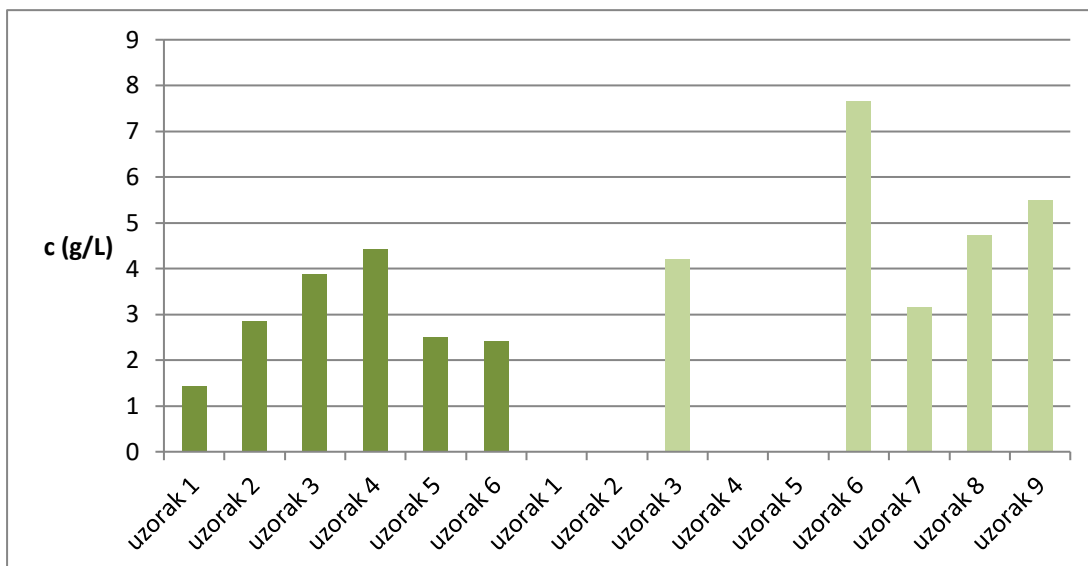
U svih šest ispitanih uzoraka komercijalno pribavljenih voćnih sokova te u pet prirodnih voćnih sokova potvrđeno je prisustvo i određen sadržaj limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 1,42 g/L do 7,66 g/L. Limunska kiselina nije detektirana u četiri uzorka prirodnog soka (sok od jabuke i višnje) (slika 7). U ostalim prirodnim voćnim sokovima na deklaraciji nije naznačen dodatak limunske kiseline pa se može zaključiti da sadržaj limunske kiseline određen u voćnom soku potječe samo od agruma.



Slika 7. Kromatogram dobiven analizom prirodnog soka od jabuke (uzorak 1)

Budući da deklaracije ispitivanih komercijalnih voćnih sokova ne navode količinu sadržane limunske kiseline, dobivene koncentracije ne mogu se usporediti s deklariranima. Međutim, postoje propisi koji reguliraju područje prehrambenih aditiva u Republici Hrvatskoj poput pravilnika o prehrambenim aditivima NN62/2010, s izmjenama i dopunama pravilnika NN 62/2011, 135/2011 i 79/2012. Navedeni propisi su u potpunosti usklađeni s propisima Europske unije koji reguliraju područje prehrambenih aditiva (Uredba komisije EU br. 1129/2011). Tako je u ovim pravilnicima propisana najveća dopuštena koncentracija limunske kiseline u voćnim sokovima te ona iznosi 3,0 g/L.

Šest uzoraka u kojima je određena veća koncentracija limunske kiseline od dozvoljene su sokovi koji sadrže naranču ili limun (uzorci 3, 6, 7, 8 i 9 prirodnog soka te uzorak 4 komercijalnog soka). Penniston i suradnici su u svojoj studiji odredili koncentraciju limunske kiseline u svježem cijedenom soku limuna i limete i ona iznosi čak 46 – 48 g/L, a u koncentratu 34 – 39 g/L (Penniston i sur., 2008). Samo komercijalni sok od višnje (uzorak 3) sadrži prekomjernu količinu limunske kiseline iako u njemu nema agruma (slika 8).



Slika 8. Koncentracija limunske kiseline u uzorcima komercijalnih i prirodnih voćnih sokova

Usporedbom rezultata analize prirodnih i komercijalnih voćnih sokova dobivenih primjenom HPLC metode s vrijednostima koje propisuju pravilnici o prehranbenim aditivima, može se zaključiti kako je koncentracija limunske kiseline veća od dozvoljene u pet sokova deklariranih kao prirodni voćni sokovi i u dva komercijalna voćna soka. Stoga je potrebno pratiti koncentraciju limunske kiseline u voćnim sokovima, neovisno o njihovom porijeklu, posebice ako ih ljudi svakodnevno koriste u svojoj prehrani.

HPLC metoda se pokazala primjenjivom za pouzdano i precizno određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata utvrđeno je da je primijenjena HPLC metoda s UV/Vis detektorom prikladna za brzo, pouzdano i precizno određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima.

U sedam od petnaest analiziranih uzoraka prirodnih i komercijalnih voćnih sokova, koncentracija limunske kiseline je veća od dozvoljenih vrijednosti koje propisuje EU (3 g/L). U četiri prirodna voćna soka (jabuka i višnja) nije dokazana limunska kiselina.

Visoke koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima mogu imati štetan učinak na ljudsko zdravlje pa je važno pratiti koncentraciju limunske kiseline u svim voćnim sokovima dostupnim na tržištu.

## **6.LITERATURA**

Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern Pharmaceutical analysis. Burlington, Elsevier, 2011, str. 430-455.

Aspergillus niger, <https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/aspergillus-niger>, pristupljeno 3.5.2019.

Belitz H, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. Berlin, Springer, 2009, str. 448-450.

Belvisi MG, Hele DJ. Cough: Citric Acid and nerves. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2006, 3, 237-241.

Citric Acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 29.4.2019.

Cui S, Ito I, Nakaji H, Iwata T, Niimi A. Induction of airway remodeling and persistent cough by repeated citric acid exposure in a guinea pig cough model. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2019, 263, 1-8.

Cooper M, Hausman R. Stanični metabolizam. U: Stanica – Molekularni pristup. Lauc G, urednik hrvatskog izdanja, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 81-94.

DeMars DS, Hollister K, Tomassoni A, Himmelfarb J, Halperin ML. Citric acid ingestion : A life-threatening cause of metabolic acidosis. *Annals of Emergency Medicine*, 2001, 38, 588-591.

Dündar A, Şengün A, Başlak C, Kus M. Effects of citric acid modified with fluoride, nano-hydroxyapatite and casein on eroded enamel. *Archives of Oral Biology*, 2018, 93, 177-186.

Effects of sodium citrate, citric acid and lactic acid on human blood coagulation, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29783879>, pristupljeno 16.5.2019.

Fifield FW, Kealey D. Principles and practice of analytical chemistry. London, Blackwell Science, 2000, str. 118-127.

Grdinić V. Potvrde identiteta: farmaceutske tvari i ljekoviti pripravci. Zagreb, Hrvatska ljekarnička komora, 2011, str. 104-105, 160-162.

HPLC Analyses of Organic Acid Using Water- Compatible Allure or Ultra C18 Columns, 2007, <http://www.restek.com>, pristupljeno 3.5.2019.



Liu ST, Hou WX, Cheng SY, Shi BM, Shan AS. Effects of dietary citric acid on performance, digestibility of calcium and phosphorus, milk composition and immunoglobulin in sows during late gestation and lactation. *Annals of Emergency Medicine*, 2014, 191, 67-75

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, 7. izdanje, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 196-207, 218-220.

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

Penniston KL, Nakada SY, Holmes R, Assimios D. Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially-Available Fruit Juice Products. *J Endourol*, 2008, 22, 567-570.

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

Silva AC, Lourenco AS, Ugulino de Araujo MC. Simultaneous voltammetric determination of four organic acids in fruit juices using multiway calibration. *Food Chemistry*, 2018, 266, 232-239.

Skoog D, West D, Holler F. Osnove analitičke kemije. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 645-648, 692-700.

Uredba komisije (EU) br. 1129/2011 o izmjeni Priloga II. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća o popisu Unije prehrambenih aditiva, 2011, Službeni list Europske Unije, L 295/1

Valcarcel M. Principles of Analytical Chemistry. Cordoba, Springer-Verlag, 2000, str. 52-72.

Venn FR. Principles and practice of bioanalysis. New York, Taylor & Francis Group, 2000, str. 49-50.

Watson D. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier, 2012, str. 1-25, 301-327.

Zheng J, Huang H, Shi MY, Zheng L, Zhou ZR. In vitro study on the wear behaviour of human tooth enamel in citric acid solution. *Wear*, 2011, 271, 2313-2321.

## **7.SAŽETAK/SUMMARY**

Limunska kiselina se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji koristi kao antioksidans i regulator kiselosti, a u većim koncentracijama može biti štetna za ljudsko zdravlje. U ovom diplomskom radu određena je koncentracija limunske kiseline u uzorcima prirodnih i komercijalno dostupnih voćnih sokova. Za određivanje limunske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, Knauer, Berlin, Njemačka) s UV/Vis detektorom, uz kolonu obrnute faze ( LiChrospher RP-18, 125 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m Merck, Darmstadt, Njemačka). Mobilna faza je bila 50 mM fosfatni pufer (pH = 2,8) s protokom 0,5 mL/min, a valna duljina detektora bila je podešena na 214 nm. Metoda je ispitana standardnim otopinama limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 1,0 g/L. U ispitivanom području metoda je bila linearna (koeficijent korelacije,  $R^2 = 0,9999$ ). Ponovljivost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je ispod 2,5%, a srednja preciznost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 3%. Granica dokazivanja bila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L što pokazuje da je metoda osjetljiva za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima. Koncentracija limunske kiseline u šest komercijalno pribavljenih voćnih sokova bila je u rasponu od 1,42 g/L (uzorak 1) do 4,42 g/L (uzorak 4). Izmjerene koncentracije u devet uzoraka prirodnih voćnih sokova iznosile su od 0 g/L (uzorak 1, 2, 4 i 5) do 7,66 g/L (uzorak 6). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je HPLC metoda brza, pouzdana i precizna za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova. Budući da je u sedam uzoraka, koncentracija limunske kiseline prelazila propisima dozvoljenu vrijednost, važno je pratiti njenu koncentraciju u svim prehrambenim proizvodima.

Citric acid is used in the pharmaceutical and food industries as an antioxidant and acid regulator, but at the higher concentrations can be harmful to human health. The concentration of citric acid in samples of natural and commercially available fruit juices is determined in this thesis. High performance liquid chromatography (HPLC, Knauer, Berlin, Germany) with UV / Vis detector together with a reversed phase column (LiChrospher RP-18, 125 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m Merck, Darmstadt, Germany) was used for the determination of citric acid. The mobile phase was 50 mM phosphate buffer (pH = 2.8) with a flow rate of 0.5 mL/min, and the detector wavelength was adjusted to 214 nm. The method was tested with standard citric acid solutions in a concentration range of 0.1 to 1.0 g/L. In the study area, the method was linear (correlation coefficient,  $R^2 = 0.9999$ ). The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD) was below 2.5%, and the intermediate precision expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 3%. The limit of detection was 0.01 g/L and the limit of quantification was 0.03 g/L indicating that the method is sensitive to the determination of citric acid concentration in fruit juices. The citric acid concentration in the six commercially obtained fruit juices ranged from 1.42 g/L (sample 1) to 4.42 g/L (sample 4). The measured concentrations in nine samples of natural fruit juices ranged from 0 g/L (sample 1, 2, 4 and 5) to 7.66 g/L (sample 6). From the obtained results, it can be concluded that the HPLC method is fast, reliable and accurate for the determination of citric acid concentration in fruit juice samples. Considering that the concentration of citric acid in seven samples exceeded the regulatory limit, it is important to monitor its concentration in all food products.

# **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 LIMUNSKKE KISELINE U VOĆNIM SOKOVIMA PRIMJENOM TEKUĆINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI

Maja Ljepović

#### SAŽETAK

Limunska kiselina se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji koristi kao antioksidans i regulator kiselosti, a u većim koncentracijama može biti štetna za ljudsko zdravlje. U ovom diplomskom radu određena je koncentracija limunske kiseline u uzorcima prirodnih i komercijalno dostupnih voćnih sokova. Za određivanje limunske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, Knauer, Berlin, Njemačka) s UV/Vis detektorom, uz kolonu obrnute faze (LiChrospher RP-18, 125 x 4,6 mm, 5 µm Merck, Darmstadt, Njemačka). Mobilna faza je bila 50 mM fosfatni pufer (pH = 2,8) s protokom 0,5 mL/min, a valna duljina detektora bila je podešena na 214 nm. Metoda je ispitana standardnim otopinama limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 1,0 g/L. U ispitivanom području metoda je bila linearna (koeficijent korelacije,  $R^2 = 0,9999$ ). Ponovljivost metode, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) bila je ispod 2,5%, a srednja preciznost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 3%. Granica dokazivanja bila je 0,01 g/L, a granica određivanja 0,03 g/L što pokazuje da je metoda osjetljiva za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima. Koncentracija limunske kiseline u šest komercijalno pribavljenih voćnih sokova bila je u rasponu od 1,42 g/L (uzorak 1) do 4,42 g/L (uzorak 4). Izmjerene koncentracije u devet uzoraka prirodnih voćnih sokova iznosile su od 0 g/L (uzorak 1, 2, 4 i 5) do 7,66 g/L (uzorak 6). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je HPLC metoda brza, pouzdana i precizna za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova. Budući da je u sedam uzoraka koncentracija limunske kiseline prelazila propisima dozvoljenu vrijednost, važno je pratiti njenu koncentraciju u svim prehrambenim proizvodima.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 8 grafičkih prikaza, 8 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Limunska kiselina, HPLC, voćni sokovi, 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. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## 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 CITRIC ACID IN FRUIT JUICES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Maja Ljepović

#### SUMMARY

Citric acid is used in the pharmaceutical and food industries as an antioxidant and acid regulator, but at the higher concentrations can be harmful to human health. The concentration of citric acid in samples of natural and commercially available fruit juices is determined in this thesis. High performance liquid chromatography (HPLC, Knauer, Berlin, Germany) with UV / Vis detector together with a reversed phase column (LiChrospher RP-18, 125 x 4.6 mm, 5 µm Merck, Darmstadt, Germany) was used for the determination of citric acid. The mobile phase was 50 mM phosphate buffer (pH = 2.8) with a flow rate of 0.5 mL/min, and the detector wavelength was adjusted to 214 nm. The method was tested with standard citric acid solutions in a concentration range of 0.1 to 1.0 g/L. In the study area, the method was linear (correlation coefficient,  $R^2 = 0.9999$ ). The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD) was below 2.5%, and the intermediate precision expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 3%. The limit of detection was 0.01 g/L and the limit of quantification was 0.03 g/L indicating that the method is sensitive to the determination of citric acid concentration in fruit juices. The citric acid concentration in the six commercially obtained fruit juices ranged from 1.42 g/L (sample 1) to 4.42 g/L (sample 4). The measured concentrations in nine samples of natural fruit juices ranged from 0 g/L (sample 1, 2, 4 and 5) to 7.66 g/L (sample 6). From the obtained results, it can be concluded that the HPLC method is fast, reliable and accurate for the determination of citric acid concentration in fruit juice samples. Considering that the concentration of citric acid in seven samples exceeded the regulatory limit, it is important to monitor its concentration in all food products.

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

Thesis includes: 39 pages, 8 figures, 8 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Citric acid, HPLC, fruit juices, 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  
**Jasna Jablan, 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

The thesis was accepted: September 2019.