# Spektrofotometrijsko određivanje umjetnog bojila (quinoline yellow) u prehrambenim proizvodima

**Herceg, Matea**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:908896

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

# SVEUČILIŠTE U SPLITU

**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**


# SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (QUINOLINE YELLOW) U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

**ZAVRŠNI RAD**


**MATEA HERCEG**

**Matični broj 1423**



**Split, Srpanj 2017.**

# SVEUČILIŠTE U SPLITU

**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**

**SMJER: KEMIJSKA TEHNOLOGIJA I MATERIJALI**

## SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (QUINOLINE YELLOW) U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

**ZAVRŠNI RAD**

**MATEA HERCEG**

**Matični broj 1423**

**Split, Srpanj 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND MATERIALS**

# SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION ARTIFICIAL DYES (QUINOLINE YELLOW) IN FOOD PRODUCTS

**BACHELOR THESIS**

**MATEA HERCEG**

**Parent number:1423**

**Split, July 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

## ZAVRŠNI RAD

**Sveučilište u Splitu**

**Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu**

**Stručni studij kemijske tehnologije, smjer Kemijska tehnologija i materijali**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na XXI. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr.sc.Maša Buljac

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJA UMJETNOG BOJILA (QUINOLINE YELLOW) U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA**

Matea Herceg, 1423

**Sažetak:**

U ovom završnom radu određivane su koncentracije umjetnog bojila (quinoline yellow) u raznim prehrambenim proizvodima spektrofotometrijskom UV/VIS metodom. Spektrofotometrijsko mjerenje je provedeno u destiliranoj vodi pri pH vrijednosti 7. Određivanje koncentracije QY provodilo se sa dvije metode (pomoću krivulje umjeravanje i metodom standardnog dodatka) u 2 tipa uzoraka (pićima, bombonima, tabletama). Usporedbom ovih dviju metoda vidimo da su veoma male razlike u dobivenim rezultatima, a što se uzoraka tiče najveće koncentracije su pronađene u Cedeviti grejp (81,374 mg/L) i Lizi (169,606mg/L).

**Ključne riječi:** azo bojila, spektrofotometrijsko određivanje, quinoline yellow

**Rad sadrži:** 47 stranica, 15 slika, 12 tablica, 0 priloga, 20 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

**1.** Izv. prof. doc. dr. sc. Marija Bralić –predsjednik povjerenstva

**2.** Doc.dr.sc. Marijo Buzuk – član

**3.** Doc. dr. sc. Maša Buljac – član - mentor

Datum obrane: 10. 07. 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, (Ruđera Boškovića 35).

# BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**

**Faculty of Chemistry and Technology Split**

**Proffesional study of chemical technology**

**Scientific area**:Natural science

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject was approved by** Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no XXI.

**Mentor:** Maša Buljac, PhD, assistant prof.

**THE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION ARTIFICIAL DYES OF (QUINOLINE YELLOW) IN FOOD PRODUCTS**

Matea Herceg, 1423

**Abstract:**

In this final work, quinoline yellow concentrations were determined in various food products by spectrophotometric UV / VIS method. Spectrophotometric measurement was carried out in distilled water at pH 7. Determination of QY concentration was performed using two methods (using the calibration curve and the standard addition method) in 2 types of samples (beverages, candies, tablets). Comparison of these two methods shows that very little differences in the results obtained, and the highest concentration of the samples, were found in cedeviti Grapefruit (81.374 mg / L) and Lysis (169.606 mg / L).

**Keywords:** azo dye, spectrophotometric method, quinoline yellow

**Thesis contains:** 47 pages, 15 images, 12 tables, 0 attachments, 20 literal references

**Original in**: Croatian

**Defence committee:**

**1**. Marija Bralić, PhD associate prof-Chair person

**2**. Marijo Buzuk, PhD assistant prof., Member

**3.** Maša Buljac, PhD assistant prof., Supervisor

Defence date: 10.07.2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, (Ruđera Boškovića 35).

*Završni rad pod nazivom: „Spektrofotometrijsko određivanje umjetnog bojila (quinoline yellow) u prehrambenim proizvodima“ izrađen je u Zavodu za kemiju okoliša pod mentorstvom doc. dr. sc. Maše Buljac.*

***Zahvala:***

*Veliku zahvalnost, ovim putem, želim uputiti izv. prof. dr. sc. Mariji Bralić i doc. dr. sc. Maši Buljac na stručnoj pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade završnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i pruženoj podršci tijekom cijelog studija koji su vjerovali u mene i onda kada ja nisam.*

# ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Zadatak ovog završnog rada je kvantitativno određivanje umjetnog bojila quinoline yellow (QY) u raznim prehrambenim proizvodima metodom UV/VIS spektrofotometrije.

# SAŽETAK:

## ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (QUINOLINE YELLOW) U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

U ovom radu određivane su koncentracije umjetnog bojila QY u raznim prehrambenim proizvodima metodom UV/VIS spektrofotometrije. Spektrofotometrijsko mjerenje je provedeno u destiliranoj vodi pri pH 7. Određivanje koncentracije QY provodilo se sa dvije metode (pomoću krivulje umjeravanje i metodom standardnog dodatka) u 2 tipa uzoraka (pićima, bombonima, tabletama). Usporedbom ovih dviju metoda vidimo da su veoma male razlike u dobivenim rezultatima, a što se uzoraka tiče najveće koncentracije su pronađene u Cedeviti grejp (81,374 mg/L) i Lizi (169,606mg/L).



**KLJUČNE RIJEČI:** azo bojila, spektrofotometrijsko određivanje, quinoline yellow


.

## ABSTRACT:

### DETERMINATION OF ARTIFICIAL DYES (QUINOLINE YELLOW) IN FOOD PRODUCTS

In this work, concentrations of artificial color QY were determined in various food products by UV / VIS spectrophotometry. Spectrophotometric measurements was performed in distilled water at pH 7. Determination of QY concentration was performed using two methods (using calibration curves and standard additive method) in 2 types of samples (beverages, candies, tablets). By comparing these two methods, we see that there are very small differences in the results obtained, with samples of the highest concentration being found in cedeviti Grapefruit (81.374 mg / L) and Lysis (169.606 mg / L).



**Keywords:** azo dye, spectrophotometric method, quinoline yellow

**SADRŽAJ:**

UVOD ..... 1
1. OPĆI DIO ..... 3
1.1 Bojila ..... 4
1.1.1 Podjela bojila ..... 5
1.1.2 Razvoj organskih sintetskih bojila ..... 5
1.1.3 Upotreba organskih sintetskih bojila ..... 6
1.1.4 Negativan utjecaj organskih sintetskih bojila na zdravlje i okoliš ..... 7
1.1.5 Azo bojila ..... 8
1.2 E104 Kinolinsko žuto, Quinoline Yellow ..... 9
1.2.1 Quinoline Yellow u namirnicama ..... 9
1.3 Tehnika određivanja ..... 10
2. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 13
2.1 Priprava otopina ..... 14
2.1.1 Priprava otopine standarda Quinoline Yellow : ..... 14
2.2 Metoda određivanja ..... 15
3. REZULTATI I RASPRAVA ..... 19
3.1 Spektrofotometrijsko određivanje Quinoline Yellow – a ..... 20
4. ZAKLJUČAK ..... 30
5. LITERATURA ..... 32

# UVOD

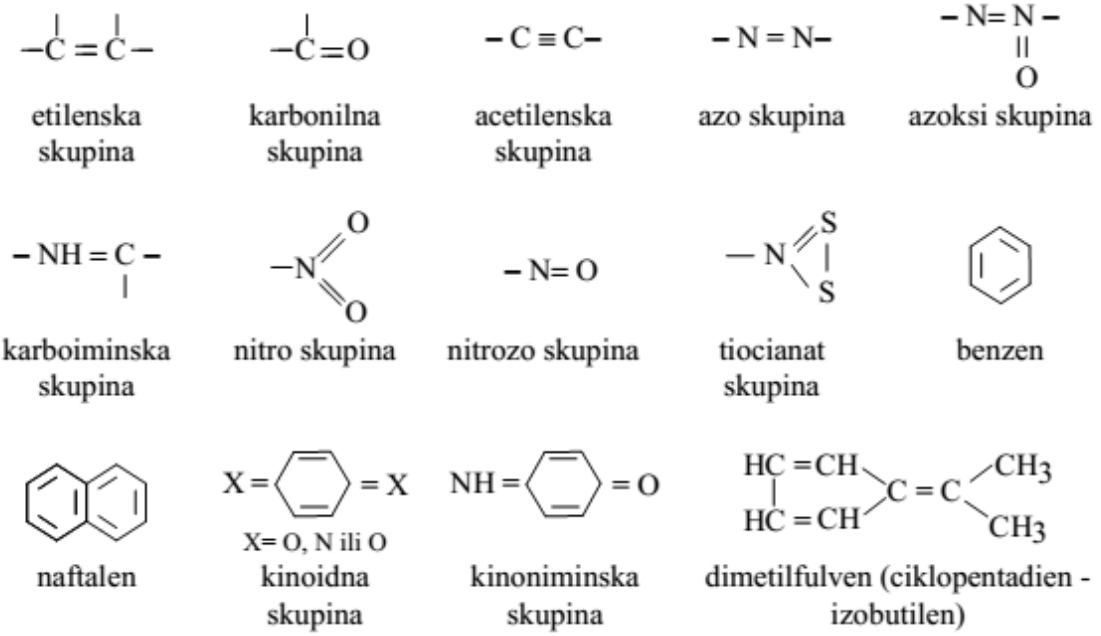
Organska sintetska bojila danas predstavljaju jedan od nezaobilaznih aditiva, a nalazimo ih u hrani, odjeći, kozmetici, lijekovima, proizvodima za osobnu higijenu, te u mnogim drugim.[1] Industrija bojila i intermedijera za njihovu proizvodnju doživjela je impresivan rast u proteklih nekoliko godina, zbog njihove sve veće i sve šire upotrebe.[2]

Upotreba bojila datira još iz vremena starih Egipćana, oko 5000 godine prije Krista, a bojila koja su se tada koristila bila su, naravno, prirodnog podrijetla.[3] Prva sintetska bojila razvijena su sredinom 19. stoljeća te je tada upotreba prirodnih bojila u potpunosti potisnuta. Proizvodnja sintetskih bojila je puno jeftinija, nijanse su svjetlije, bojila se lakše vežu na površinu tvari koja se boji. Međutim, početkom 20. stoljeća primjećeno je da pojedina sintetska bojila imaju izrazito nepovoljan utjecaj na ljudsko zdravlje te se započinje s izbacivanjem iz upotrebe nekih bojila koja su okarakterizirana kao štetna.[4] Osim nepovoljnih učinaka na zdravlje, poput kancerogenosti ili mutagenosti, sintetska bojila dospjela u okoliš iz industrije ili iz naših domova, već pri izrazito niskim koncentracijama (10-50 mg/l) utječu nepovoljno i na okoliš. Quinoline yellow je umjetno žuto bojilo, natrijeva sol disulfonske kiseline. Istraživanja su pokazala da može izazvati alergiju i dermatitis, a na njegovo djelovanje posebno su osjetljive osobe koje boluju od alergije i astme.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Bojila

Boja je u užem smislu osjet vida što ga izaziva nadražaj mrežnice oka elektromagnetskim zračenjem valne duljine između 380 i 760 nm. Prema ovoj definiciji boja nije svojstvo svijetla ni predmeta, tj. nije svojstvo fizičkog svijeta već psihički doživljaj izazvan fizičkim uzorkom, Ipak se u tehnici kao i u običnom životu govori i o boji svjetla, razumijevajući time njegov spektralni sastav, i o boji tijela, misleći pri tom na boju svjetla koja se od njih održava ili kroz njih prolazi. Boja koju doživljava promatrač komplementarna je boji apsorbiranog svjetla, npr. ako tvar apsorbira modro svjetlo, valne duljine 480 nm, ona (osvijetljena bijelim svjetlom) izgleda narančasto žuta. Tvari čije molekule apsorbiraju fotone valnih duljina izvan područja vidljivog svjetla, bilo u ultraljubičastom (valna duljina ispod 380 nm), bilo u infracrvenom području (iznad 760nm ), za ljudsko oko su bezbojne, ali se energija apsorpcije ili zračenja može mjeriti odgovarajućim instrumentima. Jednu od najranijih teorija o vezi konstitucije bojila i boje iznio je 1878. godine O.Witt.[5] Prema toj teoriji, koja u modificiranom obliku i danas još vrijedi, apsorpcija svjetla u navedenom području, a prema tome i boja organskih spojeva, uvjetovana je prisutnošću određenih skupina, tzv. kromofora, te se bojila mogu podijeliti prema ovom kriteriju.



Kromoforne skupine sadržavaju dvostruke i trostruke veze, što znači da su obojene tvari uvijek nezasićeni spojevi. Naknadno je utvrđeno da molekule nekog organskog spoja, da bi on bio obojen, moraju sadržavati određeni broj kromofora povezanih međusobno tako da su im dvostruke veze konjugirane. Tvari koje u molekuli sadrže kromofore nazvane su kromogenima. One ne moraju nužno biti obojene. Witt je pokazao da neke skupine koje mogu tvoriti soli, kao npr. , $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, -OH, $-SO_3H$ gdje je R alkilni ili arilni ostatak, ne mogu same po sebi uvjetovati obojenost, ali mogu izazvati obojenost bezbojnog kromogena ili produbiti obojenost nekog obojenog spoja. Ove su skupine nazvane auksokromima.[5]

### 1.1.1 Podjela bojila

Bojila dijelimo prema podrijetlu na prirodna i sintetska. Prirodna dijelimo na biljna, životinjska i mineralna, dok se klasifikacija sintetskih bojila vrši na osnovu njihovih svojstava, vezanih uz sami način bojenja, te na osnovu njihovog kemijskog karaktera.

Prema svojstvima bojenja, odnosno prema mogućnostima primjene, sintetska bojila se dijele na:

- Bojila topljiva u vodi (kisela, bazna, supstrantivna ili direktna, itd.)
- Bojila netopljiva u vodi (disperzna, redukcijska, bojila topljiva u mastima i uljima, itd.)
- Bojila koja se grade na vlaknu (bojila tipa naftola AS, oksidacijska bojila i bojila za fotografije u boji). [6]

Gotovo sve boje koje se danas rabe u komercijalne svrhe su sintetskog podrijetla, čime se postiglo zadovoljenje kriterija ekonomske isplativosti, uz poboljšanje postojanosti boja i učinkovitosti bojenja.

### 1.1.2 Razvoj organskih sintetskih bojila

Tijekom povijesti, različita bojila i pigmenti bili su jedan od glavnih proizvoda kojima se trgovalo. Proizvodnja gotovo svih komercijalnih proizvoda u nekoj fazi uključuje bojenje za koje se danas koristi preko 9 000 različitih bojila s 50 000 komercijalnih imena. Industrija bojila odigrala je vrlo bitnu ulogu u razvoju strukturne organske kemije, koja je zauzvrat

pružila znanstvenu podlogu industriji bojila. William H. Perkin 1856. godine slučajno je sintentizirao prvo komercijalno sintetsko bojilo, mauve ili mauvein. Iako ovo bojilo nije bilo dugo u upotrebi, otvorilo je put sintezi brojnih novih bojila, prvenstveno baziranih na spojevima dobivenima destilacijom iz katrana. Metodom pokušaja i promašaja, reakcijama spojeva iz katrana dobivena su brojna nova bojila. Osobiti napredak u proizvodnji novih bojila omogućilo je otkriće strukture dobro poznatih prirodnih bojila, što je postignuto zahvaljujući objašnjenju prirode benzenskog prstena i otkriću četverovalentnosti ugljika u organskim spojevima. Razvoj petrokemijske industrije tridesetih godina 20. stoljeća omogućio je daljnji napredak u industriji bojila.[7] Prve restrikcije za bojila korištena u hrani uvedene su već 1906. u Sjedinjenim Američkim Državama, a sljedećih 30 godina odvijao se proces daljnjeg izbacivanja iz upotrebe bojila za koja se smatralo da imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Do 1938. godine preostalo je samo 15 sintetskih bojila dopuštenih za upotrebu u hrani, za razliku od njih 80 koliko ih se koristilo na samom početku stoljeća. Od tada do danas puno toga se promijenilo u svijetu sintetskih bojila. Brojna nova su otkrivena, a još ih je više zabranjeno za daljnju upotrebu. Uvedene su mnoge restrikcije i zakonske regulative kako bi se upotreba sintetskih bojila, osobito upotreba u hrani, stavila pod kontrolu. Na primjer, u današnje vrijeme je od strane FDA (Food and Drug Administration) odobreno svega 7 bojila za upotrebu u hrani u SAD-u.

### 1.1.3 Upotreba organskih sintetskih bojila

Organska sintetska bojila razvijena su ponajviše zahvaljujući tekstilnoj industriji i njezinom razvoju u 19. stoljeću.[7] Međutim, danas se ova bojila upotrebljavaju u mnogim područjima poput kemijske industrije, medicine, u proizvodnji plastičnih masa, industriji bojila i tinte, u proizvodnji gume, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji.[6,8] Kao što je već spomenuto, proizvodnja gotovo svih komercijalnih proizvoda u nekoj fazi uključuje bojenje, zbog čega bi se moglo reći da su bojila prisutna u svim sferama života.

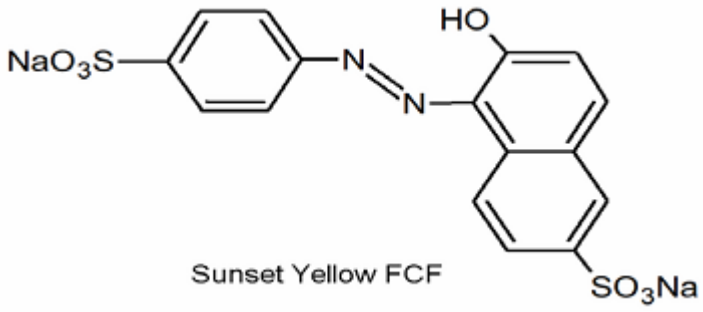
### 1.1.4 Negativan utjecaj organskih sintetskih bojila na zdravlje i okoliš

Nije poznato koliko se točno sintetskih bojila proizvodi u svijetu, međutim, prema financijskim izvještajima za 2008. godinu proizvodnja je procjenjena na $7 \times 10^5$ tona i vrijednost od 11 milijardi američkih dolara. Budući da je ova industrija u stalnom porastu, danas su ove brojke sigurno još i veće. Iz ovoga je lako zaključiti da zajedno s porastom proizvodnje sinetskih bojila, raste i ugroženost ljudi i okoliša. Opasnost od sintetskih bojila toliko je velika iz razloga što je teško kontrolirati upotrebu svih tih novih bojila koja se neprestano sintentiziraju. Za svako novo bojilo, budući da predstavlja potpuno novi spoj, nitko ne zna kako će točno utjecati na okoliš i ljudsko zdravlje. Naravno, svako od njih mora proći odgovarajuću evaluaciju kako bi se vidjelo je li pogodno za upotrebu i bezopasno za ljude, ali često se tek nakon duljeg vremena manifestira i uviđa njihova štetnost. Osim toga, većina sintetskih bojila ima aromatsku strukturu benzenskog i/ili naftalenskog tipa. Poznato je da su mnogi spojevi s takvom strukturom kancerogeni. Općenito se može reći da toksičnost spojeva raste zajedno s brojem benzenskih prstenova u strukturi molekule. Kako bi bojilo moglo ispunjavati svoju funkciju, ono mora biti stabilno, a zajedno sa stabilnošću često dolazi i perzistentnost i bioakumulativnost. Budući da se radi o umjetnim spojevima, sintetska bojila su po prirodi ksenobiotici (ksenobiotik je supstanca koja je prisutna u organizmu, ali se u njemu ne proizvodi niti se očekuje da bude prisutna), a uz to su i složenih struktura. Upravo zbog toga, u okolišu se teško razgrađuju i gube obojenost te ih je nužno ukloniti prije ispuštanja u okoliš. Međutim, proces uklanjanja takvih spojeva dugotrajan je, složen i skup prije svega, zbog čega je tvornicama (osobito onima tekstilne industrije, koje su najgori onečišćivači, uz samu proizvodnju bojila) lakše i puno jeftinije ispustiti onečišćene vode izravno u vodne resurse. Industrijske otpadne vode najčešće se neodgovarajuće pročišćavaju i kao takve završavaju u gradskoj kanalizaciji. Iz ovih podataka može se zaključiti kako će se sintetska bojila iz različitih proizvoda koji se upotrebljavaju u kućanstvima i industriji u velikom postotku naći u okolišu, pa tako i ona iz gelova za tuširanje, sapuna i šampona. Uzevši u obzir i štetnost po ljudsko zdravlje, njihov globalni utjecaj ni u kojem slučaju nije zanemariv.

### 1.1.5 Azo bojila

Azo bojila su najveća, najvažnija i najraznovrsnija skupina umjetnih bojila s ukupno 3000 različitih spojeva. Procjenjuje se da 70 % mase svih bojila koja se proizvedu otpada na azo bojila, stoga su to ujedno bojila s kojima ljudi najčešće dolaze u kontakt i koja najčešće možemo naći u okolišu. Uzrok tako široke upotrebe je lagana i jeftina sinteza, njihova stabilnost i velika raznolikost nijansi u odnosu na prirodna bojila.[9] To su bojila koje karakterizira jedna ili više azo skupina ( -N=N- ) koje se mogu nalaziti unutar benzenskog ili naftalenskog prstena ili između njih, a kao auksokromne skupine sadrže hidroksilne, sulfonske ili amino skupine. Budući da se radi o dušikovim derivatima, kao produkt razgradnje mogu nastati kancerogeni aromatski amini. Ova bojila nerijetko izazivaju kontroverze u javnosti budući da su neka od njih toksična, kancerogena, mutagena te izazivaju različite smetnje u organizmu ili alergijske reakcije. Mnoge studije povezale su konzumaciju bojila (od kojih je većina azo tipa) u slatkišima i napicima sa hiperaktivnošću i drugim poremećajima ponašanja kod djece.[10]

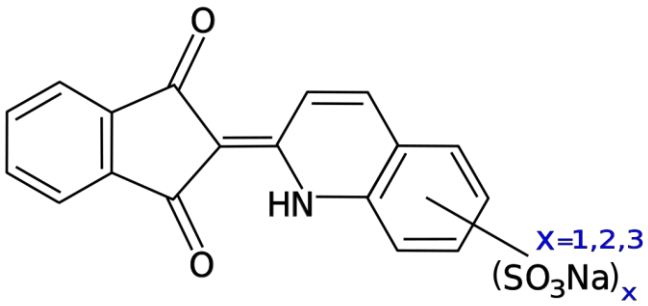
Primjer strukture azo bojila:




**Slika 1.** Kemijska struktura Sunset Yellow[10]

## 1.2 E104 Kinolinsko žuto, Quinoline Yellow

Umjetno žuto bojilo, natrijeva sol disulfonske kiseline. U kombinaciji s benzojevom kiselinom (E210) može uzrokovati sindrom hiperaktivnosti kod djece. Odlukom Europskog parlamenta koja je od 2010. godine obvezujuća za sve zemlje članice Europske unije, na deklaraciji namirnica koje sadrže jedno od sljedećih bojila: E102, E104, E110, E122, E124, E129, mora stajati upozorenje: „Može uzrokovati poremećaj aktivnosti i pažnje djece". Izbjegavati![11]




**Slika 2.** Kemijska struktura Quinoline Yellow [11]

### 1.2.1 Quinoline Yellow u namirnicama

Quinoline Yellow najviše se koristi u bojenju hrane i lijekova, a smatra se da može uzrokovati promjene na koži te je njegova upotreba u hrani i piću zabranjena u Australiji, Japanu, Norveškoj i SAD-u. Također je dokazano kako ljudi s povećanom osjetljivošću na bojilo Sunset Yellow, u pravilu pokazuju osjetljivost i na Quinoline Yellow.[12]

**Tablica 1.** Dopuštena količina Quinoline Yellow u određenim namirnicama:[11]

| DOPUŠTENA UPOTREBA | KOLIČINA |
|---|---|
| pripravci namijenjeni kontroli tjelesne mase, pripravci koji se uporabljuju pod medicinskim nadzorom | 50 mg /kg |
| džem, pekmezi, domaća marmelada i slični voćni pripravci | 100 mg /kg |
| gorka soda, gorko vino, bezalkoholni aromatizirani napitci, dodaci prehrani u tekućem obliku | 100 mg /kg |
| smrznuti aromatizirani deserti (sladoledi), deserti, uključujući aromatizirane mliječne proizvode | 150 mg /kg |
| fini pekarski proizvodi (biskviti, kolači, vafli...), grickalice: ekstrudirani začinjeni proizvodi za grickanje | 200 mg /L |
| neka alkoholna pića, aromatizirana pića na osnovi vina, aromatizirani vinski koktelski proizvodi | 200 mg /L |
| senf, dodatci prehrani u krutom obliku | 100 mg /L |
| dekoracije, ukrasi i preljevi | 500 mg /kg |

## 1.3 Tehnika određivanja

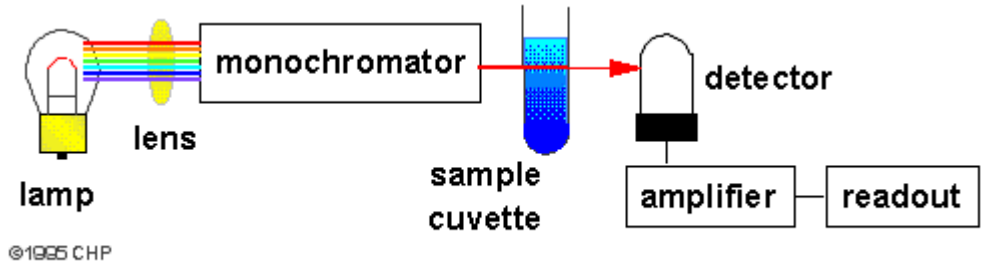
Izraz spektroskopija s povijesnog se gledišta odnosio na granu znanosti koja se bavila svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučenome u komponente, valne duljine, koje tvore spektar. Spektar je imao važnu ulogu u razvoju suvremene atomske teorije. U posljednje vrijeme spektrofotometrija je postala neizostavna tehnika za brojne analize. Ultraljubičasta

(UV) i vidljiva apsorpcijska (VIS) spektroskopija primjenjuje se za kvantitativnu, ali i za kvalitativnu analizu. To je najčešće primjenjivana tehnika, a danas je proširena i na tehnike kao što su masena, elektronska i akustička spektroskopija.

Instrumentalne metode za određivanje boje pružaju objektivne podatke, a ne subjektivni doživljaj te uz odgovarajuće održavanje i umjeravanje daju vrlo precizne i točne rezultate.

Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena od pet osnovnih dijelova:

- stabilnog izvora energije zračenja,
- selektora valnih duljina koji omogućuju izdvajanje određenog valnog područja,
- jednoga ili više spremnika za uzorke,
- detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljivi signal (najčešće električni), te
- procesora signala i uređaja za njegovo očitanje.[13]




**Slika 3.** Shematski prikaz dijelova spektrofotometar [14]

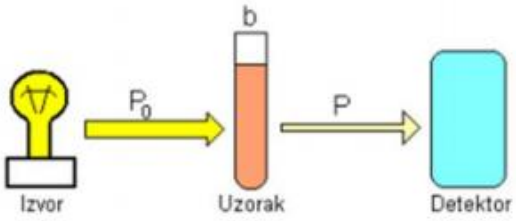
### 1.3.1 UV/VIS spektroskopija

Najvažniji pojmovi u spektrofotometriji su transmitacija i apsorbancija.

Transmitacija *(T)* otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu: $T = P / P_0$

gdje je $P_0$ ulazna snaga snopa svjetlosti, a $P$ snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije.

Transmitacija se često izražava u postotcima.




**Slika 4.** Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini[14]

Na slici 4. prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaza kroz sloj otopine debljine b (cm) i koncentracije c vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju jest smanjenje snage snopa s $P_0$ na P.

Apsorbancija (A) se definira jednadžbom:

$$A = - \log_{10} T = - \log (P / P_0) = \log (P_0 / P)$$

Nasuprot transmitaciji, apsorbancija otopine se povećava s prigušenjem osnovnog snopa. Ova jednadžba zahtjeva logaritamsku apsorbancijsku ljestvicu.

Odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao Lambert - Beerov zakon:

$$A = \log (P_0 / P) = a \cdot b \cdot c$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c je koncentracija apsorbirajuće vrste.

Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. [14]

# 2. EKSPERIMENTALNI DIO

**Kemijkalija i uzorci:**

Pri izradi ovoga rada korištena je slijedeće kemikalija:

Quinoline yellow žućkasto zelenkaste boje, topljiv u vodi, molarne mase 477,38 g/mol. [15]

Destilirana voda

Te 7 realnih uzoraka (kupljenih u lokalnoj prodavaonici):

- Strepsils
- Haribo Quaxi → nije deklarirana prisutnost QY
- Haribo Goldbaren → nije deklarirana prisutnost QY
- Liza
- Isodrink
- Fanta limun
- Cedevita grejp

## 2.1 Priprava otopina

### 2.1.1 Priprava otopine standarda Quinoline Yellow :

Pri pripravi standardne otopine Quinoline Yellow, 0,25 g je otopljeno u 250 ml destilirane vode ( $\gamma$ =1g/L ). Od ove standardne otopine napravljene su otopine slijedećih koncentracija: 5 mg/L, 10 mg/L i 50 mg/L. Sva razrjeđenja su pripravljena u 100 mL destilirane vode i to na sljedeći način:

1 mL iz 1 g/L → 10 mg/L

5 mL iz 1 g/L → 50 mg/L

10 mL iz 50 mg/L → 5 mg/L

## 2.2 Metoda određivanja

U ovom radu se određivanje QY radilo sa dvije metode:

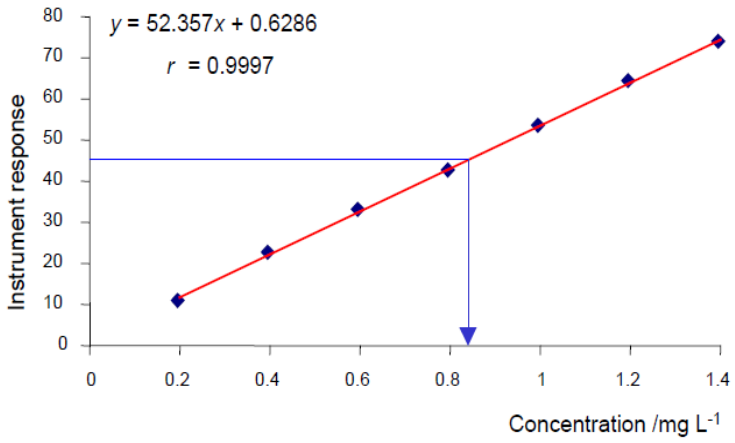
- Pomoću krivulje umjeravanja
- Metodom standardnog dodatka

**KRIVULJA UMJERAVANJA:**

Kalibracijski, baždarni ili radni dijagram prikazuje ovisnost signala prema količini analita (koncentraciji) dobiven mjerenjem signala serije standarda (standardnih otopina) pri točno određenim uvjetima. Kalibracijski dijagrami nisu uvijek linearni, često su kod niskih ili visokih koncentracija krivulje, a linearni je dio negdje u sredini takovog dijagrama. Takav linearni dio odnosa signala prema koncentraciji često nazivamo dinamičkim područjem. Dinamički dio kalibracijske krivulje može se prikazati jednadžbom pravca:

$y = a + bx$

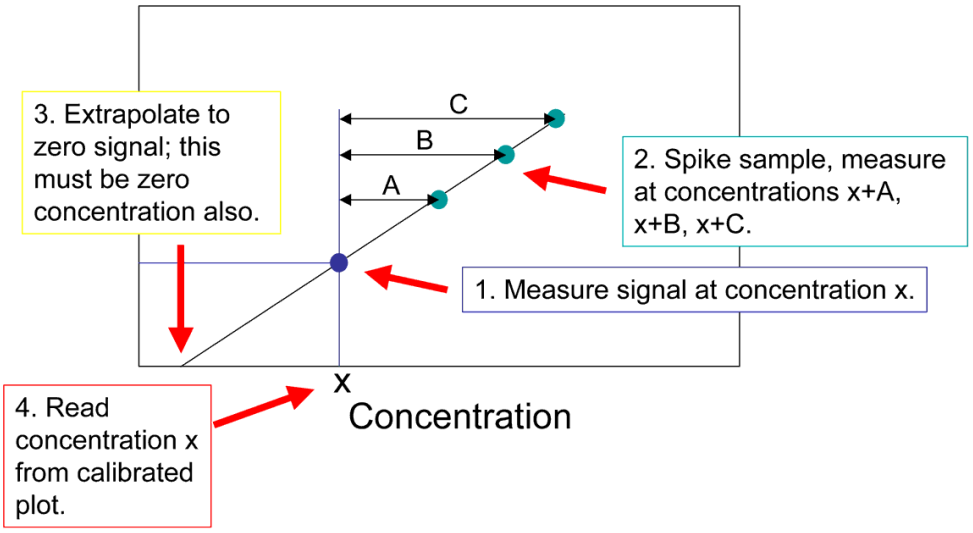
gdje je **y** signal dobiven s instrumenta, **a** je signal slijepe probe (tj. odsječak na osi signala (y), **b** je nagib pravca za ispitivani sustav (signal vs. koncentracija) koji odgovara osjetljivosti postupka, a **x** je koncentracija analita. Ako se instrument baždari na jednu čvrstu točku sa slijepom probom, najčešće jednaku nuli, jednadžba, postaje jednadžba pravca kroz ishodište a kalibracijski pravac postaje pravac kroz ishodište. Kalibracijska krivulja je najbolja metoda kalibracije ukoliko je utjecaj matrice zanemariv i ne ovisi o koncentraciji analita. Osim toga nužno je da su instrumenti na kojima se mjeri stabilni. [16]




**Slika 5.** Grafički prikaz za krivulju umjeravanja [17]

**METODA STANDARDNOG DODATKA:**

Metoda standardnog dodatka sastoji se od najmanje tri koraka. Prvi je mjerenje signala analita iz uzorka, drugi dodavanje poznate koncentracije analita a treći ponovljeno mjerenje signala analita. Sa samo jednim dodatkom poznate koncentracije analita (drugi i treći korak) nužna je pretpostavka da smo u linearnom dijelu odnosa signala i koncentracije analita. Slijedeći dodaci standardne otopine analita omogućuju veću preciznost i dokazuju ili opovrgavaju našu pretpostavku o linearnosti odziva prema koncentraciji. Najprecizniji rezultati se dobiju ako je koncentracija prvog dodatka jednaka najmanje dvostrukoj koncentraciji analita u uzorku. Metoda standardnog dodatka je posebno korisna kada je utjecaj matrice na određivanje analita znatan ili kada su koncentracije analita u uzorku vrlo blizu granice određivanja. Metodom standardnog dodatka utjecaj matrice znači postoji ali je konstantan za sva mjerenja. I kod ovog postupka kalibracije važna je stabilnost mjernog instrumenta. [16]




**Slika 6**. Grafički prikaz za metodu standardnog dodatka [18]

Krivulja umjeravanja je dobivena mjerenjem apsorbancije (na prethodno određenoj valnoj duljini). Literaturno je pronađeno da pri pH=7, valna duljina iznosi 412 nm.[16] Sedam različitih koncentracija QY je pripravljeno razrijeđivanjem standardnih otopina, prema omjerima prikazanim u tablici 2.

**Tablica 2.** Koncentracije standardnih otopina quinoline yellow-a za krivulju umjeravanja

| **Standardna otopina** | **Koncentracija standardne otopine QY** | **Volumen standardne otopine QY (mL)** | **V($H_2O$)(mL)** | **c(QY) u tikvici** | **Apsorbancija** |
|---|---|---|---|---|---|
| **1.** | **1 g/L** | 2 | 98 | 20 mg/L | 1,6077 |
| **2.** | **1 g/L** | 1 | 99 | 10 mg/L | 0,8525 |
| **3.** | **50 mg/L** | 10 | 90 | 5 mg/L | 0,4210 |
| **4.** | **50 mg/L** | 6 | 94 | 3 mg/L | 0,2590 |
| **5.** | **10 mg/L** | 10 | 90 | 1 mg/L | 0,0881 |
| **6.** | **5 mg/L** | 10 | 90 | 0,5 mg/L | 0,0425 |
| **7.** | **5 mg/l** | 4 | 96 | 0,2 mg/L | 0,0178 |

Valna duljina je određena "skeniranjem" otopine QY koncentracija 0,2 - 20 mg/L kroz cijelo valno područje. Utjecaj destilirane vode na apsorbanciju kroz cijelo valno područje je SLIJEPA PROBA. Za određivanje QY u realnim uzorcima korištena je i metoda standardnog dodatka. U tu svrhu se u određeni volume otopine realnog uzorka dodavala standardna otopina kao što je prikazano u tablici 3.

**Tablica 3**. Postupak pripreme otopina za metodu standardnog dodatka

| **Standardna otopina** | **Volumen otopljenog uzorka** | **Volumen standardne otopine QY c(QY)=10mg/L** | **V($H_2O$) (mL)** | **c(standardne otopine QY u tikvici)** |
|---|---|---|---|---|
| **1.** | 10 | 0 | 40 | 0 |
| **2.** | | 2,5 | 37,5 | 0,5 |
| **3.** | | 5 | 35 | 1 |
| **4.** | | 10 | 30 | 2 |
| **5.** | | 20 | 20 | 4 |

Svi kruti uzorci su otopljeni u 100 mL destilirane vode i to na sljedeći način:

- Tableta Strepsils – tableta je smrvljena u tarioniku i potom izvagano 2,0143 g te otopljeno u destiliranoj vodi.
- Haribo Quaxi (HQ) – izvagano je 2,0050 g bombona, te otopljeno u destiliranoj vodi, uz zagrijavanje (zbog prisustva želatine).
- Haribo Goldbaren (HG) – izvagano je 1,9895 g bombona, te otopljeno u destiliranoj vodi, uz zagrijavanje (zbog prisustva želatine).
- Liza – liza je smrvljena u tarioniku i potom izvagano 2,0007 g te otopljeno u destiliranoj vodi.
- Cedevita (grejp) – izvagano je 2,0016 g Cedevite, te otopljeno u destiliranoj vodi.

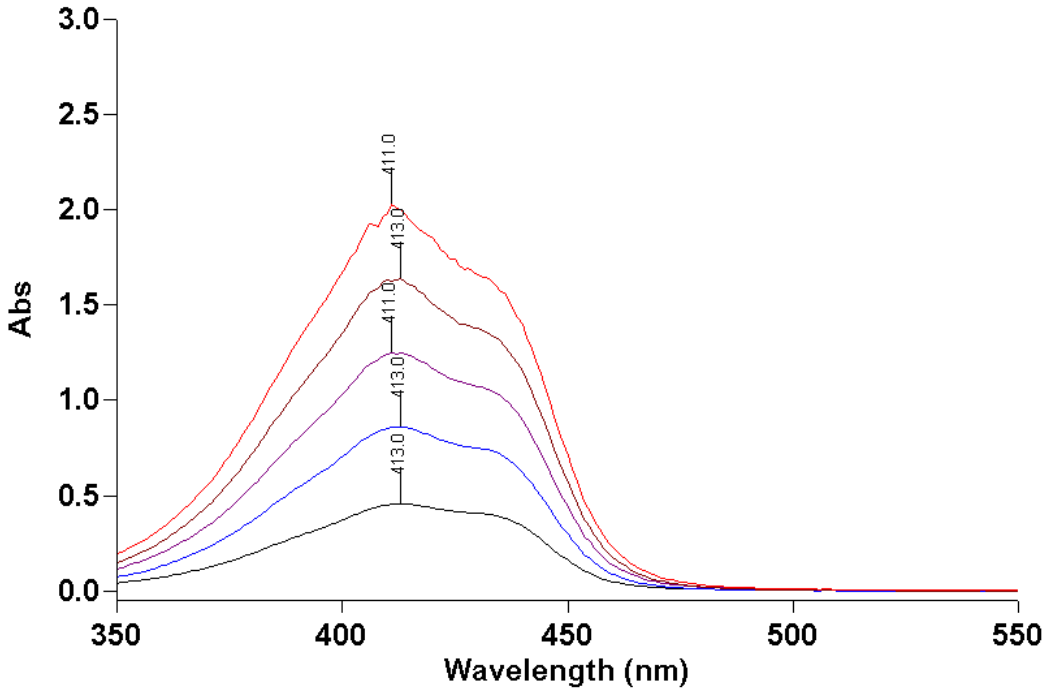
Priprava tekućih uzoraka:

- Fanta limun – uzorak se najprije zagrijava, kako bi se otpustio ugljikov (IV) oksid ($CO_2$) Nakon što se sav ($CO_2$) otpustio, otpipetirano je 25 mL uzorka., otopljeno u ultračistoj vodi i nadopunjeno do oznake u tikvici od 100 mL.
- Isodrink – negazirani napitak. Odpipetirano je 25 mL uzorka i prebačeno u tikvicu od 100 mL koja je nadopunjena do oznake.

# 3. REZULTATI I RASPRAVA

## 3.1 Spektrofotometrijsko određivanje Quinoline Yellow – a

Prikazan je scan za seriju standarda poznatih koncentracija. Prema literaturnim podatcima, valna duljina pri kojoj se javlja pik, iznosi 412 nm pri pH=7. [19]

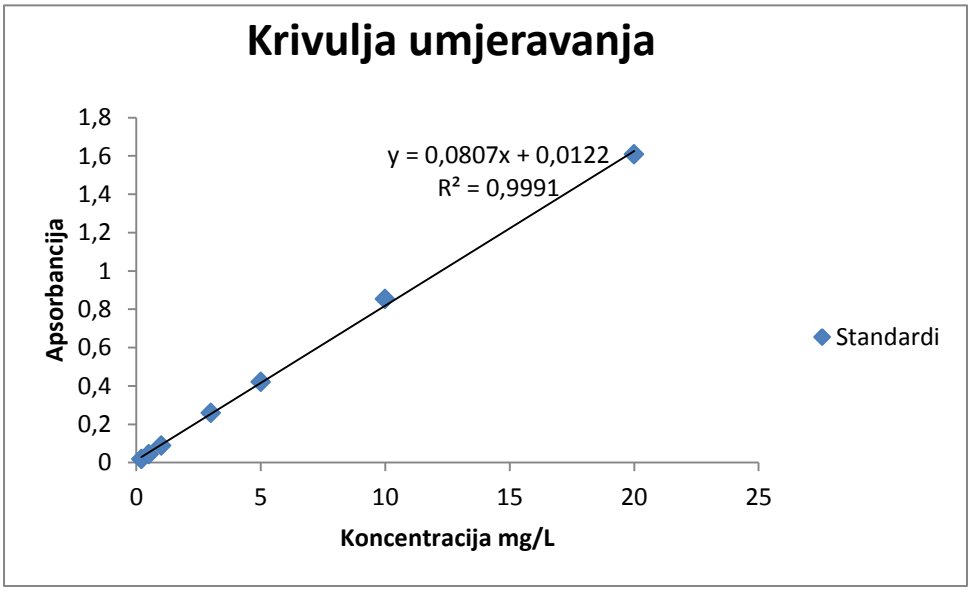



**Slika 7**. Prikaz scan-a u području valne duljine od 350 – 550 nm za sljedeće koncentracije QY: 0,5; 1, 1,5; 2, 2,5 mg/L

Iz rezultata je vidljivo da se pikovi javljaju na valnoj duljini od 411 i 413 nm, što odgovara literaturnim podatcima. Nakon dobivenog scan-a, pripravljeni standardi su podvrgnuti spektrofotometrijskom mjerenju s ciljem dobivanja krivulje umjeravanja.

**Tablica 4.** Koncentracije standardnih otopina quinoline yellow-a za krivulju umjeravanja

| Standardna otopina | c (QY) u tikvici | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 20 mg/L | 1,6077 |
| **2.** | 10 mg/L | 0,8525 |
| **3.** | 5 mg/L | 0,4210 |
| **4.** | 3 mg/L | 0,2590 |
| **5.** | 1 mg/L | 0,0881 |
| **6.** | 0,5 mg/L | 0,0425 |
| **7.** | 0,2 mg/L | 0,0178 |




**Slika 8.** Krivulja umjeravanja standardnih otopina

Iz ovako dobivene krivulje umjeravanja, određene su koncentracije QY u pripravljenim otopinama realnih uzoraka

Iz prethodonog grafa (Slika 8.), pomoću jednadžbe pravca, izračunate su koncentracije ispitivanih uzoraka prema sljedećem izrazu: $\gamma = \frac{Abs - 0{,}0122}{0{,}0807}$

**Tablica 5.** Određene koncengtracije QY u pripravljenim otopinama realnih uzoraka

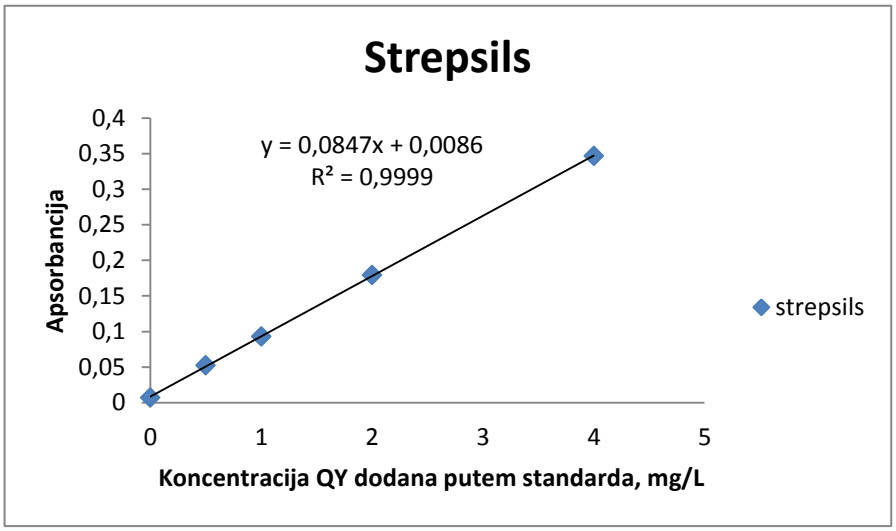
| Uzorci | Apsorbancija | Masena koncentracija mg/L |
|---|---|---|
| **Strepsils** | 0,0497 | 0,4646 |
| **Haribo Goldbaren** | 0,0945 | 1,0198 |
| **Haribo Quaxi** | 0,0623 | 0,6208 |
| **Liza** | 0,2871 | 3,4064 |
| **Cedevita** | 0,2087 | 2,4349 |
| **Fanta** | 0,2440 | 2,8723 |
| **Isodrink** | 0,3837 | 4,6034 |

Iz Tablice 5. i Slike 8.,vidljivo je da se koncentracije realnih uzoraka nalaze u području koncentracija pripravljenih standarda.

Koncentracija QY u realnim uzorcima je utvrđena i metodom standardnog dodatka i to u otopinama koje su pripravljene kako je i opisanu u eksperimentalnom dijelu.

**Tablica 6.** Metoda standardnog dodatka za Strepsils. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0070 |
| **2.** | 0,5 | 0,0524 |
| **3.** | 1 | 0,0930 |
| **4.** | 2 | 0,1792 |
| **5.** | 4 | 0,3467 |




**Slika 9.** Metoda standardnog dodatka za Strepsils

Na osnovu ovih podataka izračunata je koncentracija QY koja se nalazi u uzorku Strepsils tablete (m=2,0143g) odnosno u jednom kg.

$A=0{,}0847 \times \gamma + 0{,}00866$

$$\text{Za } A=0 \rightarrow \gamma = \frac{0{,}00866}{0{,}0847} = 0{,}102 \text{ mg/L}$$

$$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = \frac{0{,}102 \times 50}{10} = 0,102 \times 5 = 0{,}511 \text{ mg/L}$$

$m = \gamma \times V = 0{,}511 \times 0{,}1 = 0{,}05$ mg

m(Strepsils) = 2,0143 g

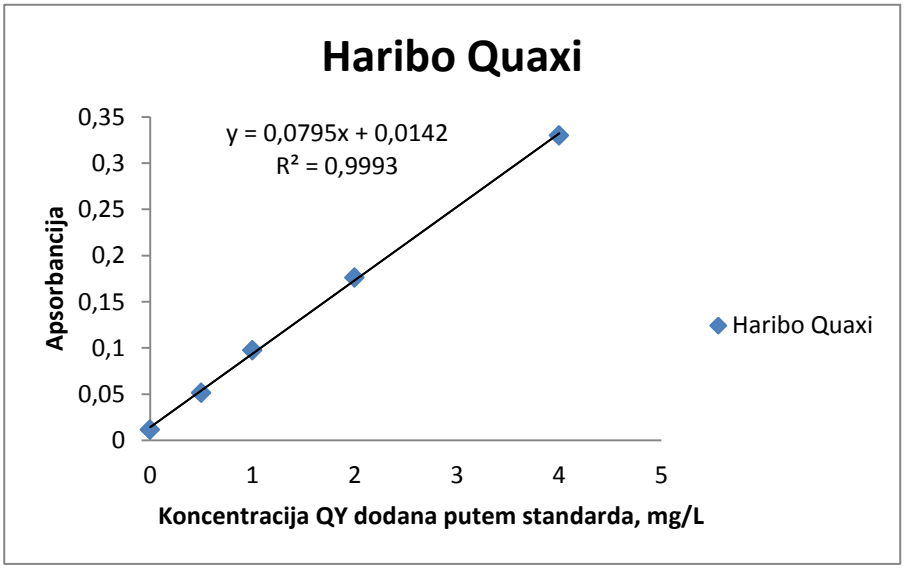
2,0143 ~ 0,05 mg

1000 ~ X

$\gamma_{QY\ u\ Strepsils} = 25{,}386$ mg/kg

**Tablica 7.** Metoda standardnog dodatka za Haribo Quaxi. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0116 |
| **2.** | 0,5 | 0,0516 |
| **3.** | 1 | 0,0977 |
| **4.** | 2 | 0,1763 |
| **5.** | 4 | 0,3298 |




**Slika 10.** Metoda standardnog dodatka za Haribo Quaxi

Na osnovu ovih podataka izračunata je koncentracija QY koja se nalazi u uzorku Haribo Quaxi (m=2,0050g) odnosno u jednom kg.

$A=0{,}0795 \times \gamma + 0{,}0142$

$$\text{Za } A=0 \rightarrow \gamma = \frac{0{,}0142}{0{,}0795} = 0{,}1785 \text{ mg}/L$$

$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = 0{,}1785 \times 5 = 0{,}893 \text{mg/L}$

m = 0,893 mg/L × 0,1 = 0,0893 mg

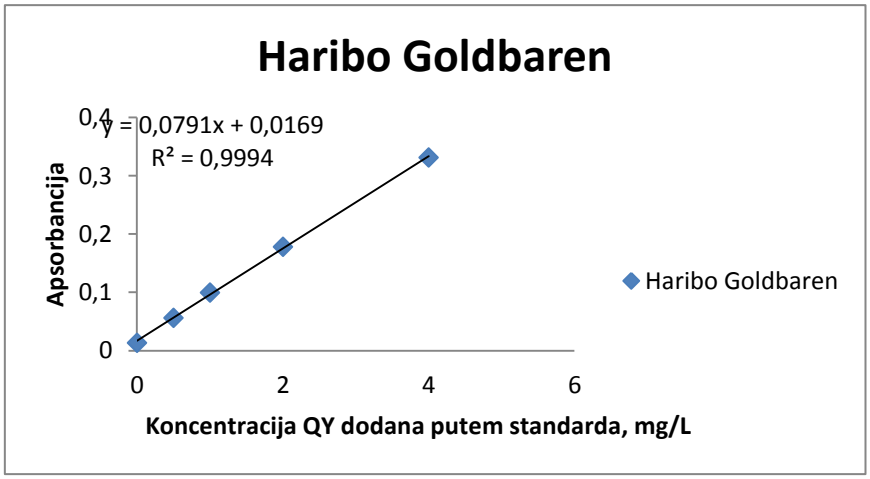
2,0050 g ~ 0,0893 mg

1000 ~ X

$\gamma_{\text{QY u 1 kg HQ}} = 44{,}522 \text{ mg/kg}$

**Tablica 8.** Metoda standardnog dodatka za Haribo Goldbaren. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0134 |
| **2.** | 0,5 | 0,0560 |
| **3.** | 1 | 0,0994 |
| **4.** | 2 | 0,1776 |
| **5.** | 4 | 0,3312 |




**Slika 11.** Metoda standardnog dodatka za Haribo Goldbaren

Na osnovu ovih podataka izračunata je koncentracija QY koja se nalazi u uzorku Haribo Goldbaren (m=1,9895g) odnosno u jednom kg.

$A=0{,}0791 \times \gamma + 0{,}0169 \rightarrow \gamma = 0{,}214$ mg/L

$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = 1{,}069$ mg/L

$m(HG) = 1{,}9895$g

$m = 1{,}069 \times 0{,}1 = 0{,}1069$ mg

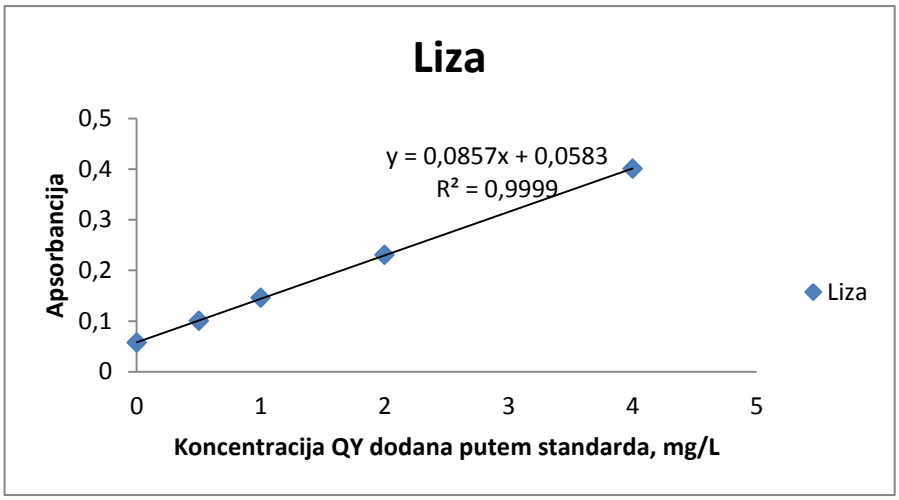
1,9898 g ~ 0,1069 mg

1000 ~ X

$\gamma_{\text{QY u 1kg HG}} = 53{,}732$ mg/kg

**Tablica 9.** Metoda standardnog dodatka za Lizu. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0574 |
| **2.** | 0,5 | 0,1004 |
| **3.** | 1 | 0,1456 |
| **4.** | 2 | 0,2306 |
| **5.** | 4 | 0,4003 |




**Slika 12.** Metoda standardnog dodatka za Lizu

$A = 0{,}0857 \times \gamma + 0{,}0583 \rightarrow \gamma = 0{,}681$

$\gamma_{QY\ u\ pripravljenoj\ otopini\ uzorka} = 3{,}404\ mg/L$

m(Lize) = 2,007g

$m = 3{,}404 \times 0{,}1 = 0{,}3404\ mg$

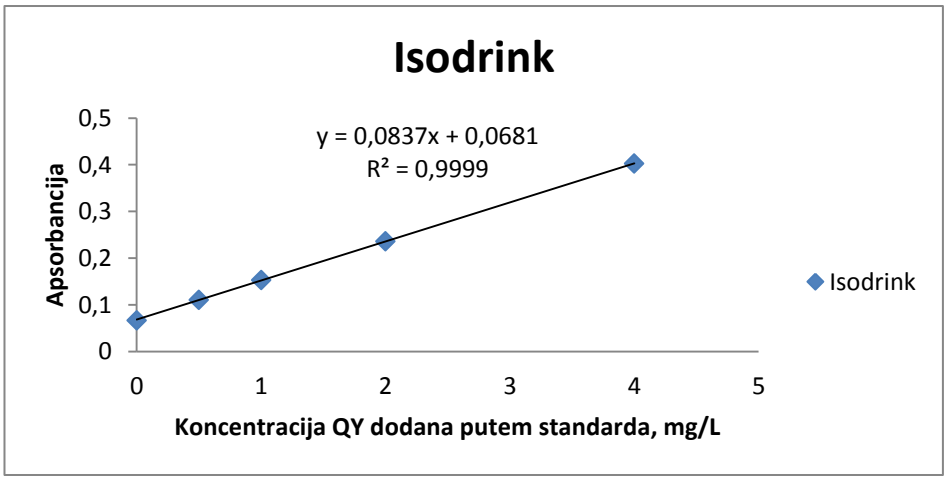
2,007 g ~ 0,3404 mg

1000 ~ X

$\gamma_{QY\ u\ 1\ kg\ Lize} = 169{,}606\ mg/L$

**Tablica 10.** Metoda standardnog dodatka za Isodrink. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0665 |
| **2.** | 0,5 | 0,1108 |
| **3.** | 1 | 0,1527 |
| **4.** | 2 | 0,2358 |
| **5.** | 4 | 0,4026 |




**Slika 13.** Metoda standardnog dodatka za Isodrink

$A = 0{,}0838 \times \gamma + 0{,}0681 \rightarrow \gamma = 0{,}8122$ mg/L

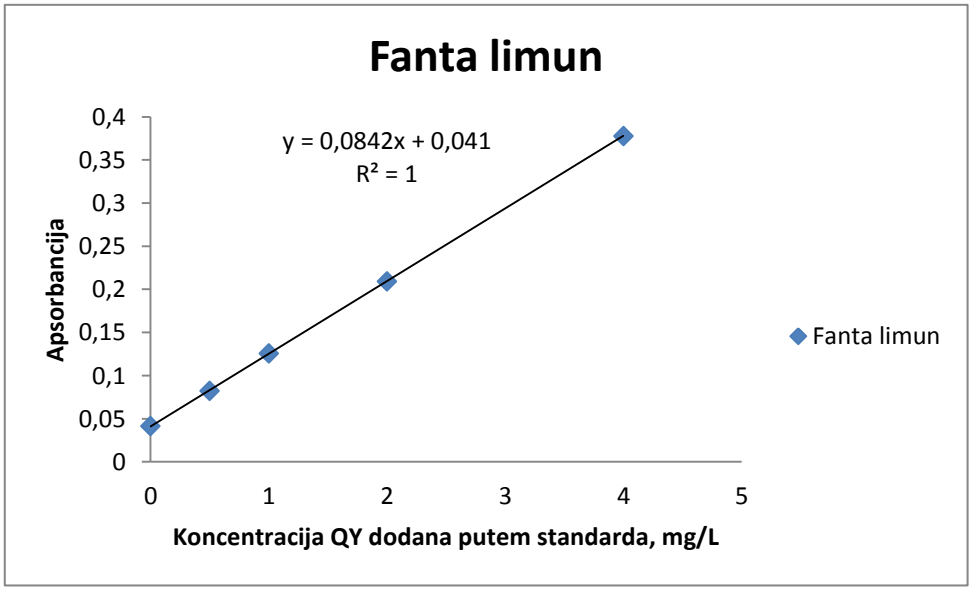
V(Isodrinka) = 10 mL

$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = 4{,}061$ mg/L

$\gamma_{\text{QY u 1 L Isodrinku}} = \frac{4{,}061 \times 0{,}1}{0{,}025} = 16{,}24$ mg/L

**Tablica 11.** Metoda standardnog dodatka za Fantu limun. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0414 |
| **2.** | 0,5 | 0,0852 |
| **3.** | 1 | 0,1256 |
| **4.** | 2 | 0,2093 |
| **5.** | 4 | 0,3779 |




**Slika 14.** Metoda standardnog dodatka za Fantu limun

$A = 0{,}0842 \times \gamma + 0{,}041 \rightarrow \gamma = 0{,}4866\ \text{mg/L}$

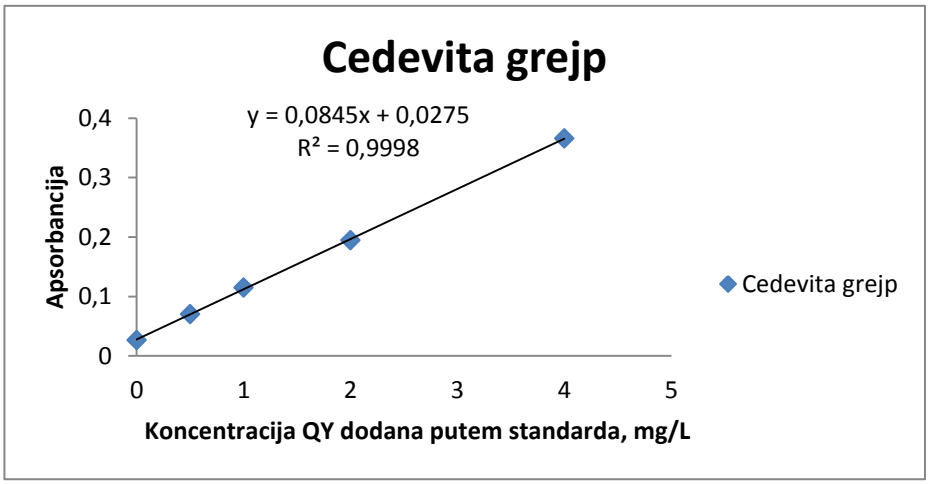
$V(\text{Fante limun}) = 10\ \text{mL}$

$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = 2{,}433\ \text{mg/L}$

$\gamma_{\text{QY u 1 L Fante limun}} = 9{,}732\ \text{mg/L}$

**Tablica 12.** Metoda standardnog dodatka za Cedevitu grejp. Volumen otopine realnog uzorka je 10 mL.

| Standard | c (QY) u tikvici iz otopine standarda mg/L | Apsorbancija |
|---|---|---|
| **1.** | 0,0 | 0,0265 |
| **2.** | 0,5 | 0,0699 |
| **3.** | 1 | 0,1145 |
| **4.** | 2 | 0,1943 |
| **5.** | 4 | 0,3657 |




**Slika 15.** Metoda standardnog dodatka za Cedevitu grejp

$A = 0{,}0845 \times \gamma + 0{,}0275 \rightarrow \gamma = 0{,}326\ \text{mg/L}$

$\gamma_{\text{QY u pripravljenoj otopini uzorka}} = 1{,}629\ \text{mg/L}$

$\gamma_{\text{QY u 1 L Cedevite grejp}} = 81{,}374\ \text{mg/L}$

# 4. ZAKLJUČAK

- Nakon provedenog mjerenja ustanovljeno je da umjetnog bojila QY ima u svim uzorcima, pa čak i u onim uzorcima na kojima to nije navedeno na deklaraciji.
- Određivanje koncentracije QY provodilo se sa dvije metode (pomoću krivulje umjeravanje i metodom standardnog dodatka) u 2 tipa uzoraka, krutim i tekućim (pićima, bombonima, tabletama).
- Usporedbom ovih dviju metoda vidili smo da su male razlike u dobivenim rezultatima.
- Najveće koncentracije su pronađene u Cedeviti grejp – 81,374 mg/L i Lizi - 169,606 mg/ kg.
- Spektrofotometrijski dobivene koncentracije za krute i tekuće uzorke, ulaze u Pravilnikom (NN 62/2010) dopuštene vrijednosti. [20] Dopuštena koncentracija QY u bezalkoholnim aromatiziranim pićima je do 200 mg/L, kao i za grickalice, dok je za medicinske pripravke ona znatno manja i iznosi 50 mg/kg.

# 5. LITERATURA

[1] R. Jain, V.K. Gupta, S. Sikarwar, Adsorption and desorption studies on hazardous dye Naphthol Yellow S, *Journal of Hazardous Materials* **182,** (2010), 749–756.

[2] http://www.foodcolorworld.com/global-dyestuff-industry.html [31.5.2017.]

[3] P. Mpountoukas, A. Pantazaki, E. Kostareli, P. Christodoulou, D. Kareli, S. Poliliou, C. Mourelatos, V. Lambropoulou, T. Lialiaris, Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine, *Food and Chemical Toxicology* **48,** (2010), 2934-2944.

[4] https://www.forbes.com/sites/rachelhennessey/2012/08/27/living-in-color-the-potential-dangers-of-artificial-dyes/#5941056c107a [31.5.2017.]

[5] Tehnologija bojila i pigmenata, *Zavod za polimerno inženjerstvo i organsku kemiju*, Fakultet kemijskog inženerstva i tehnologije, Interna skripta

[6] I. Gudelj, J. Hrenović, T.L. Dragičević, F. Delaš, V. Šoljan i H. Gudelj, Azo boje, njihov utjecaj na okoliš i potencijal biotehnološke strategije za njihovu biorazgradnju i detoksifikaciju**,** *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62,** (2011), 91.-100.

[7] https://www.britannica.com/technology/dye [31.5.2017.]

[8] http://www.dyes-pigments.com/synthetic-dyes.html [31.5.2017.]

[9] R.G. Saratale, G.D. Saratale, J.S. Chang, S.P. Govindwar, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **42,** (2011), 138–157.

[10] https://www.journals.elsevier.com/food-chemistry [1.6.2017.]

[11] https://e-brojevi.udd.hr/104.htm [1.6.2017.]

[12] http://www.ukfoodguide.net/e104.htm [1.6.2017.]

[13] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije* **1669**, 968, Zagreb, Školska knjiga, 491 – 536

[14] https://repozitorij.ktf-split.hr/islandora/object/ktfst%3A53/datastream/PDF/view [28.06.2017.]

[15] https://en.wikipedia.org/wiki/Quinoline_Yellow_WS [28.06.2017.]

[16] https://www.scribd.com/document/84168958/metoda-standardnog-dodatka [28.06.2017.]

[17] https://www.certara.com/wp-content/uploads/2014/08/CalibrationCurve-Bioanalytical.png [28.06.2017.]

[18] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Standard_addition.gif [28.06.2017.]

[19] http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039914096019170 [1.6.2017.]

[20] http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2010_05_62_1981.html [4.7.2017.]