Optimiziranje metode za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima

Jagić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:319124

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Katarina Jagić

Optimiziranje metode za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku botaniku, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, na pruženoj pomoći, strpljenju i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na potpori te na korištenju sredstava i potrebne laboratorijske opreme Zavoda.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi uvijek bili najveća podrška tijekom studiranja.

SADRŽAJ

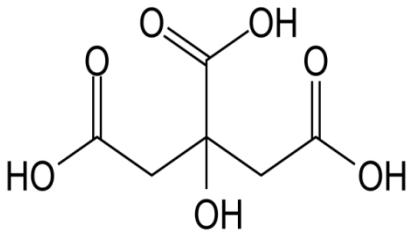
1.UVOD 1
1.1. Limunska kiselina 2
1.1.2. Upotreba limunske kiseline 3
1.1.3. Limunska kiselina i ljudsko zdravlje 4
1.2. Kromatografske metode odjeljivanja 5
1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC 5
1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a 7
1.3. Validacija metode 9
1.3.1. Točnost 9
1.3.2. Preciznost 10
1.3.3. Specifičnost i selektivnost 10
1.3.4. Granica dokazivanja i granica određivanja 11
1.3.5. Linearnost i područje mjerenja 11
1.3.6. Otpornost 11
2. OBRAZLOŽENJE TEME 13
3. MATERIJALI I METODE 15
3.1. Kemikalije 16
3.1.1. Korištene kemikalije: 16
3.2. Aparatura 16
3.2.1. Korištena aparatura: 16
3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a: 16
3.2.3. Uvjeti na HPLC-u 16
3.3. Uzorci 17
3.4. Određivanje koncentracije limunske kiseline pomoću HPLC-a 17
3.4.1. Priprema otopina 17
3.4.2. Priprema uzoraka 19
4. REZULTATI I RASPRAVA 20
4.1. Uvođenje metode za određivanje limunske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom .. 21
4.2. Validacija metode za određivanje limunske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom . 24
4.2.1. Linearnost 24
4.2.2. Preciznost 25

4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja 27
4.3. Rezultati ispitivanja uzoraka voćnih sokova analiziranih na HPLC s UV/Vis 27
5. ZAKLJUČCI 30
6. LITERATURA 32
7. SAŽETAK/SUMMARY 35
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/
BASIC DOCUMENTATION CARD

1.UVOD

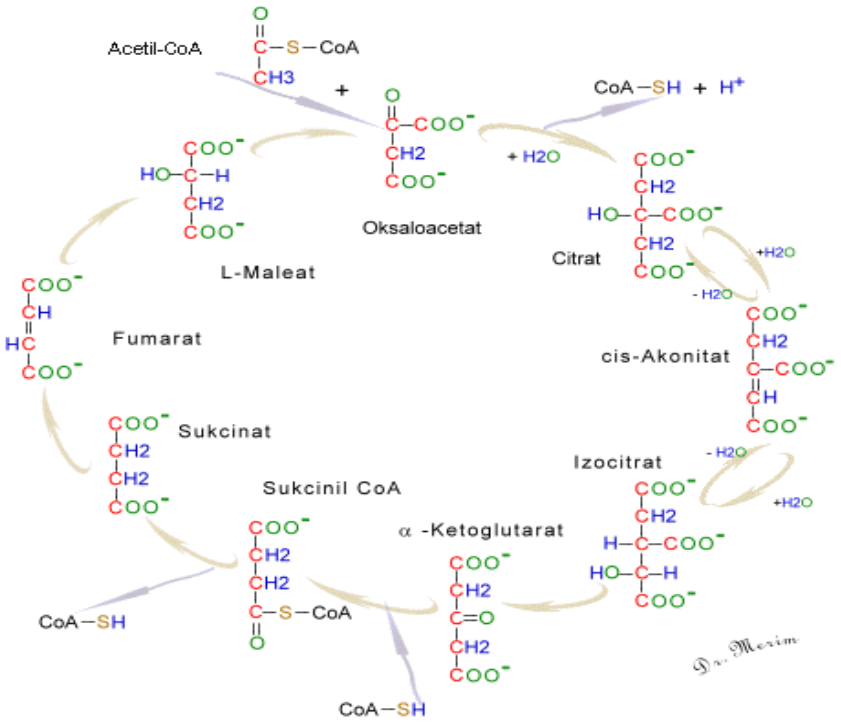
1.1. Limunska kiselina

Limunska kiselina (2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kiselina; slika 1) je slaba organska trikarboksilna kiselina. Bijela je kristalična tvar, male molarne mase (M = 192,12 g/mol) i lako je topljiva u vodi.



Slika 1. Kemijska struktura limunske kiseline (Izvor: https://www.nudenicotine.com)

U stanici limunska kiselina nastaje kao međuprodukt tijekom Krebsovog ciklusa koji se naziva još i ciklus limunske kiseline. Ciklus limunske kiseline je metabolički proces u mitohondrijima, koji povezuje razgradnju ugljikohidrata, lipida i proteina (Penniston i sur., 2008). Ciklus limunske kiseline prikazan je na slici 2. U najvećoj količini limunsku kiselinu proizvode biljke roda *Citrus* poput limuna, naranče, mandarine, klementina, grejpa i limete (slika 3).



Slika 2. Ciklus limunske kiseline (Izvor: http://www.healthbosnia.com)



Slika 3. Voće s najvećim udjelom limunske kiseline: limun, limeta, mandarina, grejp i naranča (Izvor: https://www.agroklub.com; https://www.organicfacts.net)

1.1.2. Upotreba limunske kiseline

Limunska kiselina se industrijski dobiva ili iz limuna ili iz šećera fermentacijom pomoću plijesni *Aspergillus niger* (Max i sur., 2010). Zbog jednostavne proizvodnje, limunska kiselina ima veliku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. U prehrambenoj industriji koristi se kao aditiv, kako bi se osigurao kiseli okus hrane i pića. Osim za poboljšanje okusa koristi se i za povećanje stabilnosti gaziranih pića te sprječava promjenu boje uzrokovanu procesom oksidacije.

Limunska kiselina primjenjuje se i u različitim farmaceutskim pripravcima kao antioksidans i konzervans te osigurava stabilnost aktivnih komponenti pripravka. Koristi se u proizvodnji pjenušavih tableta i vitaminskih pripravaka. Pored toga, s obzirom da sprječava zgrušavanje krvi vežući na sebe kalcijeve ione u krvi, koristi se i kao antikoagulans. Soli limunske kiseline s različitim metalima (poput kalcijevog citrata ili magnezijevog citrata) koriste se kao biološki raspoloživi oblici minerala.

Budući da smanjuje tvrdoću vode i potiče stvaranje pjene, limunska kiselina se dodaje i detergentima, sredstvima za čišćenje, kozmetičkim preparatima te higijenskim i ostalim proizvodima (Penniston i sur., 2008; Soccol i sur., 2006; Weikle, 2012).

1.1.3. Limunska kiselina i ljudsko zdravlje

Limunsku kiselinu nalazimo u ljudskoj krvi i u urinu. Pri fiziološkom pH krvi limunska kiselina se nalazi pretežito u obliku trivalentnog aniona, citrata. U takvom obliku u manjoj mjeri je i u urinu.

Izloženost ljudi visokim koncentracijama limunske kiseline može imati štetne posljedice za zdravlje. Prilikom inhalacije dolazi do konstrikcije dišnih puteva i kašlja, a ingestija prevelike količine može uzrokovati abdominalne bolove. Učestala primjena različitih voćnih i gaziranih pića koja sadrže limunsku kiselinu uzrokuje eroziju zubne cakline te smanjuje njenu tvrdoću i do 84% (Wang i sur., 2014; Weikle, 2012).

S druge strane, urinarni citrat djeluje kao inhibitor kristalizacije kalcijevih soli te tako pomaže u sprječavanju formiranja bubrežnih kamenaca. 65% do 90% filtriranog citrata se reapsorbira u proksimalnom tubulu bubrega, a ostatak se izlučuje u urin. Ionizirani oblik limunske kiseline djeluje tako da kompleksira kalcijeve ione u bubrežnim tubulima, povećava tako njihovu topljivost te smanjuje koncentraciju slobodnog kalcija u urinu. Kao rezultat, sprječava se stvaranje i nakupljanje kalcij fosfata i kalcij oksalata te posljedično i stvaranje bubrežnog kamenca. Također, citrat se veže na površinu kristala kalcij oksalata inhibirajući tako rast i agregaciju kristala, a ima ulogu i u blokiranju vezanja kristala na bubrežne epitelne stanice (Zuckerman i Assimos, 2009; Lerma, 2015; Penniston i sur., 2008). Kod većine bolesnika s problemima stvaranja bubrežnih kamenaca se javlja hipocitraturija, definirana kao ekskrecija citrata u urin u količini manjoj od 320 mg dnevno (Lerma, 2015).

Za pacijente koji ne toleriraju primarnu terapiju citratom kao alternativni izbor su se pokazali učinkovitima upravo voćni sokovi koji sadrže visoke koncentracije limunske kiseline. Tako je provedena studija u kojoj se ispitivao utjecaj soka od limuna na izlučivanje citrata kod pacijenata s hipocitraturnom nefrolitijazom. Kod 10 od 11 ispitanika utvrđeno je povećanje razine urinarnog citrata te dokazana učinkovitost voćnog soka (Kang i sur., 2007). U drugoj studiji ispitanici su uzimali sok od limuna razrijeđen u 2 L vode, 4 puta dnevno. Osim povećanog izlučivanja citrata, dokazano je i smanjenje izlučivanja kalcija u urinu (Seltzer i sur., 1996).

1.2. Kromatografske metode odjeljivanja

Kromatografske metode omogućavaju brzo i djelotvorno odjeljivanje pojedinih sastojaka iz smjese tvari te njihovu identifikaciju i kvantitativnu analizu. Temelje se na razdiobi sastojaka između mobilne i stacionarne faze koje se međusobno ne miješaju. Sastavnice smjese se međusobno odjeljuju uslijed različitog stupnja interakcije s česticama stacionarne faze. Mobilna faza može biti plin, tekućina ili superkritična tekućina, a stacionarna faza može biti krutina, tekućina nanesena na krutinu ili gel. S obzirom na tehniku izvođenja kromatografija može biti kolonska ili plošna. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze te može uključivati razdiobu, adsorpciju, ionsku izmjenu, raspodjelu prema veličini čestica i stereokemijske interakcije između otopljenih tvari i molekula vezanih na stacionarnu fazu (Skoog i sur., 1999; Luterotti, 2002).

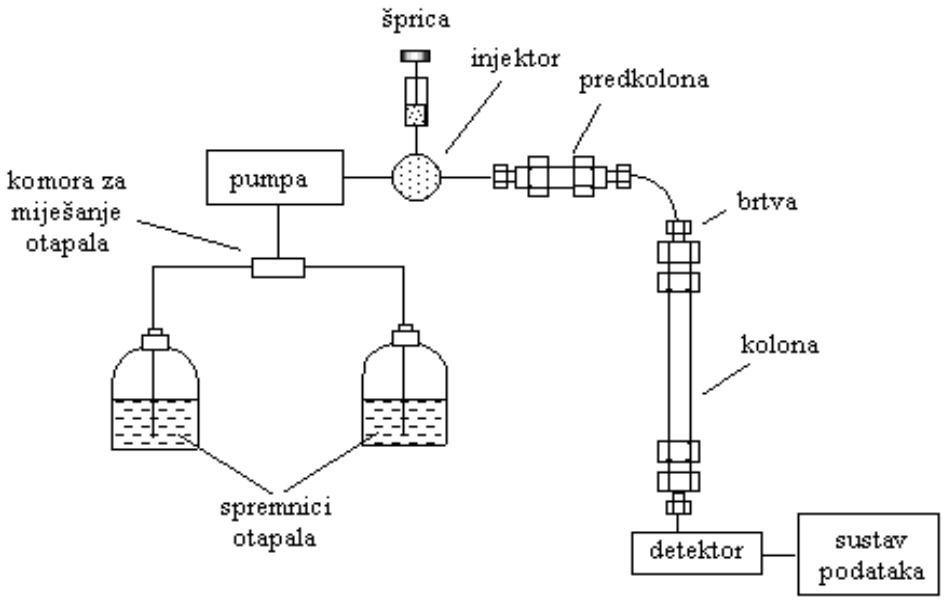
1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography,* HPLC) je tekućinska razdjelna kromatografija. Tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz kolonu napunjenu česticama nosača stacionarne faze (veličine 3-10 μm) noseći sa sobom sastavnice uzorka. Budući da se tijekom HPLC analize koriste vrlo sitne čestice nosača stacionarne faze, nužna je primjena visokog tlaka uz pomoć pumpe (400-600 bara) čime se postiže preciznija, točnija i brža analiza te bolja separacija sastavnica uzorka (Skoog i sur., 1999).

Tekućinska razdjelna kromatografija se dijeli na normalno faznu i obrnuto faznu kromatografiju. U tekućinskoj razdjelnoj kromatografiji normalnih faza koristi se polarna stacionarna faza, poput polarnih skupina vezanih na čestice silikagela, a mobilna faza je nepolarna, npr. heksan i diklormetan te se polarni spojevi eluiraju posljednji. Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna (čestice silikagela čija je površina modificirana dodatkom ugljikovodika), a mobilna faza je polarna (voda, metanol). U ovom slučaju polarni sastojci će se eluirati prvi, a što je mobilna faza polarnija duže se zadržavaju nepolarni spojevi.

Ovisno o sastavu mobilne faze tijekom analize, razlikujemo izokratno i gradijentno eluiranje. Kod izokratne eluacije ne mijenja se sastav mobilne faze tijekom eluacije. Kod gradijentne eluacije sastav mobilne faze se kontinuirano ili skokovito mijenja čime se postiže veća djelotvornost odjeljivanja sastavnica uzorka te kraće vrijeme eluacije (Skoog i sur., 1999; Skoog i Leary, 1992; Luterotti, 2002).

Mobilna faza se unosi u sustav pomoću visokotlačne pumpe te protječe stalnom brzinom (0,1-10 mL/min). Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom u sustav za injektiranje tzv. petlju (zapremine 5 do 500 μL), kako ne bi došlo do pada tlaka. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz petlju te nosi sa sobom uzorak na kolonu gdje se pojedine sastavnice (komponente) uzorka razdvajaju. Nakon razdvajanja, pojedinačne komponente uzorka dolaze do detektora redom kojim su eluirane s kolone. Zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata zove se kromatogram. Signal detektora pojavljuje se kao odmak od osnovne linije, a intenzitet signala proporcionalan je koncentraciji komponente te se ona može izračunati iz visine ili površine signala (Luterotti, 2002; Wessley i Zech, 1979).



Slika 4. HPLC sustav – shematski prikaz (Izvor: Luterotti, 2012)

Glavne komponente HPLC sustava su: spremnici za mobilnu fazu, sustav za obradu otapala, pumpa, komutacijski ventil, injektor, pretkolona, kromatografska kolona, detektor, računalo te spremnik za iskorištenu mobilnu fazu (slika 4).

1.2.2. Osnovni dijelovi HPLC-a

- **Spremnici za otapala mobilne faze**

  Spremnici za otapalo, odnosno mobilnu fazu, su posude od stakla ili nehrđajućeg čelika volumena 500 mL ili više. Prije početka analize, iz mobilne faze moraju se ukloniti otopljeni plinovi kako mjehurići ne bi oštetili kolonu ili izazvali širenje vrpci što će otežati detekciju. Također se i ostala, eventualno prisutna onečišćenja u mobilnoj fazi, moraju ukloniti filtracijom. Otplinjavanje mobilne faze se obavlja primjenom vakuuma, refluksom, odnosno destilacijom ili propuhavanjem inertnog plina (helij ili dušik). Tim postupkom ne smije doći do promjene sastava mobilne faze. Sustavi za pročišćavanje mogu biti sastavni dio HPLC aparature ili se plinovi i onečišćenja iz mobilne faze uklanjaju prije priključivanja spremnika u sustav HPLC-a (Skoog i sur., 1988; Štraus i sur., 1997).

- **Pumpa**

  Zbog male veličine čestica nosača stacionarne faze, otežan je protok mobilne faze kroz kromatografsku kolonu pa je nužno primijeniti tlak da bi se protok održao. Pumpa treba održavati konstantan i reproducibilan tlak te omogućiti kontrolirani protok mobilne faze u rasponu 0,1-10 mL/min. Postoji tzv. „*single displacement*“ pumpa koja se sastoji od jedne štrcaljke u kojoj je određeni volumen mobilne faze. Dobro kontroliranom brzinom tekućina se potiskuje kroz kolonu dok se pumpa ne isprazni, a tada se mora ponovno puniti. Takva pumpa je nepogodna za visoke protoke i mora se često ponovno puniti mobilnom fazom pa se u praksi najčešće koriste protočne pumpe kontroliranog protoka. Kontroliranim pumpama može se obavljati gradijentna elucija gdje se primjenjuju dva ili više otapala različite polarnosti čijim miješanjem se povećava efikasnost odjeljivanja (Štraus i sur., 1997).

- **Uređaj za unošenje uzoraka (injektor)**

  Uređaj za unošenje uzorka, odnosno injektor, mora omogućiti unošenje uzorka u sustav bez pada tlaka i prekida protoka mobilne faze. Volumen injektiranja iznosi 5-500 μL. Danas se najčešće primjenjuje unošenje uzorka u sustav pomoću petlje. Kod takvog sustava nema prekida protoka mobilne faze, a posebna cjevčica fiksnog volumena (tzv. petlja) puni se otopinom uzorka u fazi injiciranja pri čemu je ventil

okrenut tako da onemogućava prolaz prema koloni. Višak uzorka se uklanja, a prebacivanjem ventila mobilna faza prolazi kroz petlju i odnosi sa sobom uzorak na kolonu. Postoje i automatski injektori čija uporaba u velikoj mjeri pojednostavljuje rukovanje cijelim sustavom te sprječava i smanjuje mogućnost pogreške koja može biti posljedica ručnog injiciranja (Skoog i sur., 1999; Skoog i Leary, 1992; Štraus i sur., 1997).

- **Kolona**

Na kromatografskoj koloni međusobno se razdvajaju sastavnice (komponente) uzorka. Kolone za HPLC su najčešće izrađene od nehrđajućeg čelika, punjene odgovarajućom stacionarnom fazom. Osim analitičke kolone gdje se odvija razdvajanje komponenti uzorka, postoje i pretkolone čija je uloga zaštita analitičke kolone tako što zadržavaju onečišćenja iz uzorka i otapala. Analitička kolona i pretkolona su uvijek punjene istom stacionarnom fazom.

Većina analitičkih kolona su dužine 10-30 cm s unutrašnjim promjerom 4-10 mm, dok su čestice punila veličine 5-10 μm. Danas se proizvode i manje kolone, dužine 3-7,5 cm, unutrašnjeg promjera 1-4,6 mm, punjene česticama veličine 3-5 μm. Takve kolone omogućuju bržu analizu i manju potrošnju mobilne faze što smanjuje troškove ukupne analize. Iako se najveći broj analiza provodi na sobnoj temperaturi, uz kolonu se može vezati i sustav za kontrolu temperature budući da povišenje temperature skraćuje vrijeme zadržavanja na koloni i povećava efikasnost kolone.

Danas na tržištu postoji veliki broj različitih punila za kolone. U uporabi su najčešće mikroporozni silikageli na čije se površinske silanolne skupine kemijski vežu različiti alifatski lanci sa ili bez funkcionalnih skupina. Tako se dobivaju sorbensi različitog stupnja polarnosti, od potpuno nepolarnih stacionarnih faza do ionskih izmjenjivača. Zahvaljujući tome, sorbensi na bazi silikagela rabe se kod svih principa kromatografskog odjeljivanja. Od drugih nosača koriste se primjerice molekulska sita, celuloza i aktivni ugljen. Postoje i kapilarne kolone sa stacionarnom fazom nanesenom na stijenku kolone. Osnovni uvjet kojeg mora zadovoljavati punilo za kolone je mehanička otpornost na pritiske kojima su izložena protokom mobilne faze (Skoog i sur., 1999; Štraus i sur., 1997).

- **Detektor**

  Izbor detektora za HPLC analizu ovisi o prirodi ispitivanog uzorka. Detektori mogu pratiti značajke mobilne faze ili otopljene tvari, točnije analita. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa je analit, tj. otopljena tvar dokazana neizravno promjenom tih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari (analita) poput apsorpcije u UV/Vis ili IR području, flurescencija ili struja na elektrodi. Najčešće se koriste UV/Vis detektor s diodnim nizom koji omogućuje snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis području te fluorescentni, elektrokemijski, refraktometrijski i maseni detektori (Skoog i sur., 1999; Luterotti, 2002).

1.3. Validacija metode

Validacija se definira kao postupak kojim se utvrđuje odgovara li djelotvornost neke metode zahtjevima za određenu analitičku primjenu. Ona jamči da će se u propisanim uvjetima primjene određenog analitičkog postupka dobiti valjani rezultati. Validacija se provodi pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode te pri izmjeni bilo kojeg dijela prethodno validirane analitičke metode. Namjena analitičke metode određuje validacijske značajke i parametre koji se procjenjuju. Tipični parametri koji se moraju ispitati i uzeti u obzir su: točnost, preciznost, specifičnost i selektivnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i područje mjerenja te otpornost (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

1.3.1. Točnost

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Utvrđivanje točnosti provodi se najmanje na pet koncentracijskih razina uz najmanje tri ponovljena mjerena svakog uzorka određene koncentracijske razine. Odstupanje od stvarne vrijednosti iskazuje se najčešće kao analitički prinos, R (engl. *Recovery*):

$$R = \frac{X}{X\ stvarno} \times 100$$

Točnost se određuje u radnom području metode nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti te se mora stalno ispitivati i kontrolirati u laboratoriju jer na rezultate utječu greške u radu, rad analitičara i mjernih instrumenata, ispravnost i čistoća pribora te drugi čimbenici (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.3.2. Preciznost

Preciznost metode govori o slaganju između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod strogo propisanim uvjetima. Kako bi se ispitala preciznost provodi se pet do šest mjerenja na dvije do tri različite koncentracije. Najčešće se izražava kao relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation,* RSD) te se izražava kao %:

$$RSD = \frac{SD}{X} \times 100$$

pri čemu je SD standardna devijacija, a X srednja vrijednost dobivenih rezultata (Nigović i sur., 2014).

Preciznost se može iskazati kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost pokazuje podudaranje rezultata dobivenih istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, isti laboratorij, isti instrument) u kratkom vremenskom intervalu. Srednja preciznost pokazuje odstupanje rezultata dobivenih u istom laboratoriju, ali pod različitim uvjetima (različit analitičar, različit instrument) kroz duži vremenski period, dok obnovljivost označava postotak odstupanja rezultata dobivenih u različitim laboratorijima (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

1.3.3. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost se definira kao sposobnost analitičke metode da nedvojbeno razlikuje samo jedan analit od ostalih prisutnih u uzorku. Selektivnost analitičke metode je definirana kao sposobnost metode da kvantitativno odredi analit u prisustvu drugih komponenata u uzorku (poput onečišćenja, razgradnih produkata, pomoćnih tvari). Analitička metoda može biti više ili manje selektivna, a specifičnost je najviši stupanj selektivnosti (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

1.3.4. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (engl. *limit of detection,* LOD) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja sa sigurnošću može biti detektirana, ali ne nužno i kvantificirana, u zadanim uvjetima metode. Granica određivanja (engl. *limit of quantification,* LOQ) predstavlja najmanju količinu analita koju kvantitativno možemo odrediti u nekom uzorku s prihvatljivom točnošću i preciznošću, u propisanim uvjetima metode. Iskazuju se formulama:

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

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, ostatno standardno odstupanje regresijskog pravca, ili standardno odstupanje y odsječka regresijskog pravca, dok je a nagib kalibracijskog pravca (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

1.3.5. Linearnost i područje mjerenja

Linearnost analitičke metode odražava njezinu sposobnost da unutar određenog intervala rezultati analize budu direktno proporcionalni količini analita prisutnog u uzorku. Kako bi se utvrdila linearnost, potrebno je metodu ispitati kroz tri do šest mjerenja s najmanje pet različitih koncentracija. Grafički se prikazuje ovisnost izmjerenog analitičkog signala o koncentraciji analita te se tako dobije kalibracijska krivulja. Linearnost metode se iskazuje koeficijentom korelacije regresijskog pravca pri čemu mora vrijediti $R^2 < 1{,}0$. Područje mjerenja označava interval između najviše i najniže količine analita u uzorku (uključujući i granične vrijednosti) za koje je dokazano da primijenjena analitička metoda ima zadovoljavajuću razinu točnosti, preciznosti i linearnosti. Preporučeno radno područje za određivanje sadržaja aktivne tvari je 80-120 % (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

1.3.6. Otpornost

Otpornost analitičke metode pokazuje koliko su rezultati mjerenja, dobiveni tom metodom, neosjetljivi na manje promjene radnih uvjeta mjerenja. Prosuđuje se variranjem jednog parametra, dok ostali ostaju nepromijenjeni, a izbor parametara za ispitivanje

otpornosti izrazito ovisi o samoj metodi. Indikator je pouzdanosti analitičke metode tijekom njezine uobičajene primjene uz male promjene uvjeta u kojima se provode analize (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Limunska kiselina je slaba organska kiselina koja u stanici nastaje ciklusom limunske kiseline. U najvećoj mjeri je proizvode biljke roda *Citrus.* Zbog jednostavne proizvodnje limunska kiselina ima veliku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje se prvenstveno koristi kao antioksidans i konzervans.

Upravo zbog velike upotrebe limunske kiseline u prehrambenoj industriji, ali i zbog popularnosti zdravog načina života, koji uključuje unošenje velike količine voća i povrća, povećan je unos limunske kiseline u ljudski organizam. Iako je dokazano da povećani unos limunske kiseline ima pozitivan učinak kod pacijenata s bubrežnim kamencima, učinak povišenih koncentracija limunske kiseline na ljudsko zdravlje još uvijek nije detaljno istražen. Poznato je da izloženost visokim koncentracijama limunske kiseline može imati štetne posljedice za zdravlje, a zabilježeni poremećaji su erozija zubne cakline te abdominalni bolovi. Upravo stoga važno je pratiti koncentraciju limunske kiseline u proizvodima kojima su ljudi svakodnevno izloženi kako bi se mogao povezati unos limunske kiseline s ljudskim zdravljem.

Cilj ovoga istraživanja bio je uvesti pouzdanu analitičku metodu za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova. Za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima korištena je HPLC obrnute faze s UV/Vis detektorom. Uvedena metoda je validirana određivanjem njene linearnosti, preciznosti, granice dokazivanja i granice određivanja pomoću standardnih otopina limunske kiseline.

Rezultati ovog istraživanja trebali bi ponuditi metodu koja osigurava brzu, pouzdanu i točnu analizu koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

3.1.1. Korištene kemikalije:

- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ortofosforna kiselina, o-H_3PO_4, min 85%, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- metanol, CH_3OH, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- standard limunske kiseline, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD

Sve korištene kemikalije bile su *p.a.* čistoće, dok je metanol, upotrijebljen za kondicioniranje HPLC uređaja, bio HPLC čistoće. Za pripremu otopina korištena je MilliQ voda.

3.2. Aparatura

3.2.1. Korištena aparatura:

- analitička vaga, Acculab, Sartorius group, Bradford, SAD
- pH metar, MP220, Mettler Toledo, Švicarska
- ultrazvučna kupelj, Transsonic T570, Elma, Singen, Njemačka
- HPLC uređaj, Knauer, Berlin, Njemačka

3.2.2. Dijelovi korištenog HPLC-a:

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

3.2.3. Uvjeti na HPLC-u

Korištena mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Mobilna faza dobivena je otapanjem 6,8 g KH_2PO_4 u 0,5 L MilliQ vode. Potom je otopini podešen pH na 2,8 dodatkom 85%-tne o-H_3PO_4 te je do 1,0 L dodana MilliQ voda. Protok mobilne faze

podešen je na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa. Volumen injektiranja standardnih otopina limunske kiseline i otopina uzoraka bio je 50 μL. S obzirom da je korišten injektor s petljom volumena 100 μL važno je pažljivo unošenje uzorka u petlju.

Na početku i na kraju rada s HPLC uređajem, HPLC uređaj je kondicioniran. Za kondicioniranje uređaja korištena je 50%-tna otopina metanola. I 50 %-tna otopina metanola, i mobilna faza, prije korištenja na HPLC uređaju prethodno su stavljene u ultrazvučnu kupelj kako bi se uklonio višak otopljenog zraka, a koji bi mogao oštetiti analitičku kolonu.

Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru podešena je na 214 nm.

Kontrola samog procesa HPLC analize i obrada dobivenih rezultata s UV/Vis detektora provedena je pomoću softvera Eurochrom 2000 Software.

3.3. Uzorci

Uzorci različitih voćnih sokova (n = 5) kupljeni su u obližnjoj trgovini. Držani su zaštićeni od svjetlosti u zamrzivaču na +4 °C do pripreme za analizu.

3.4. Određivanje koncentracije limunske kiseline pomoću HPLC-a

3.4.1. Priprema otopina

Mobilna faza

Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera, pH 2,8. Iz molekularne mase KH_2PO_4 (M=136,09) izračunato je da je potrebno otopiti 6,8 g KH_2PO_4 u 1,0 L MilliQ vode. Odvaga 6,8 g KH_2PO_4 kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 500 mL te do oznake nadopunjena s MilliQ vodom. Nakon što je KH_2PO_4 otopljen u MilliQ vodi, otopini je podešen pH na 2,8 dodatkom 85%-tne o-H_3PO_4 te je otopina potom nadopunjena s MilliQ vodom do 1,0 L. Kiseli pH mobilne faze potreban je kako bi limunska kiselina ostala protonirana jer se tako ostvaruje najbolja interakcija s C18 stacionarnom fazom analitičke kolone (Kowalski i Wittrig, 2007). Prije upotrebe, mobilna faza je stavljena u ultrazvučnu kupelj kako bi se uklonio višak otopljenog zraka.

Matična otopina standarda limunske kiseline

Matična otopina standarda limunske kiseline pripremljena je otapanjem 200 mg komercijalno pribavljene limunske kiseline u 100 mL MilliQ vode. Koncentracija osnovne matične otopine iznosila je 2,0 g/L.

Standardne otopine limunske kiseline

Iz osnovne matične otopine limunske kiseline pripremljen je niz standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Standardne otopine limunske kiseline pripremljene su razrjeđivanjem s MilliQ vodom. U tablici 1 prikazan je postupak razrjeđivanja. Tako pripremljene standardne otopine injektirane su u HPLC uređaj.

Tablica 1. Koncentracije i postupak izrade standardnih otopina limunske kiseline

Koncentracija standardne otopine limunske kiseline (g/L)	**Postupak pripreme standardnih otopina limunske kiseline**	**Ukupno razrjeđenje u odnosu na matičnu otopinu**
1,0	5 mL matične otopine standarda limunske kiseline koncentracije 2,0 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	2 x
0,5	5 mL standardne otopine limunske kiseline koncentracije 1,0 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	4 x
0,25	5 mL standardne otopine limunske kiseline koncentracije 0,5 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	8 x
0,125	5 mL standardne otopine limunske kiseline koncentracije 0,25 g/L nadopunjeno do 10 mL s MilliQ vodom	16 x

3.4.2. Priprema uzoraka

Voćni sokovi (n=5) za HPLC analizu pripremljeni su razrjeđivanjem s deioniziranom vodom u volumnom omjeru 1 : 9. U tablici 2 navedeni su ispitivani uzorci i postupak razrjeđenja. Tako razrijeđeni uzorci injektirani su u HPLC uređaj.

Tablica 2. Uzorci voćnih sokova i postupak pripreme za HPLC analizu

Uzorci voćnih sokova	**Postupak razrjeđenja deioniziranom vodom**
1. Uzorak 1	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
2. Uzorak 2	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
3. Uzorak 3	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom
4. Uzorak 4	1 mL uzorka soka nadopunnjeno do 10 mL deioniziranom vodom
5. Uzorak 5	1 mL uzorka soka nadopunjeno do 10 mL deioniziranom vodom

4. REZULTATI I RASPRAVA

S obzirom na čestu upotrebu limunske kiseline u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, ljudi su svakodnevno izloženi pripravcima koji sadrže limunsku kiselinu. Iako je raznim istraživanjima pokazano da limunska kiselina ima utjecaj na ljudsko zdravlje, učinak visokih koncentracija limunske kiseline u organizmu još uvijek nije detaljno istražen. Stoga je važno pratiti koncentraciju limunske kiseline u različitim pripravcima, a kako bi se izloženost ljudi limunskoj kiselini mogla povezati s mogućim nastankom bolesti.

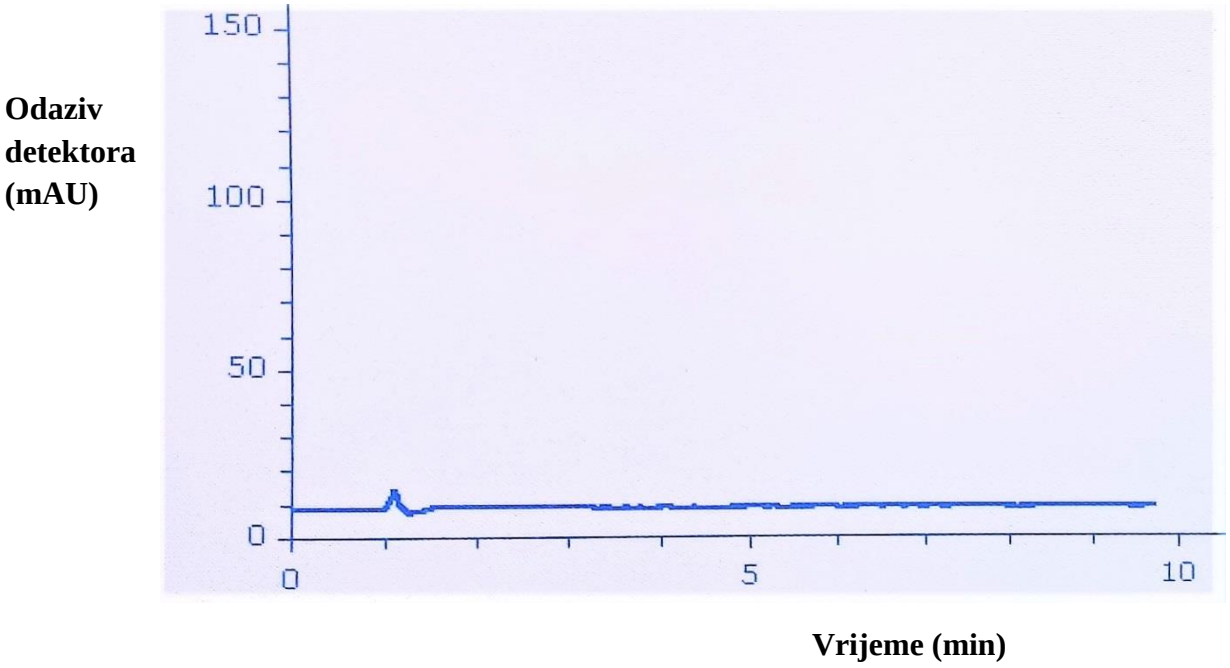
Za kvalitativno i kvantitativno određivanje limunske kiseline koriste se spektrofotometrijske i kromatografske metode. Najraširenija metoda za mjerenje koncentracije limunske kiseline u biološkim i prehrambenim uzorcima je HPLC metoda. U odnosu na spektrofotometrijsko određivanje, određivanjem koncentracije limunske kiseline pomoću HPLC-a povećava se osjetljivost i selektivnost metode, prije svega zato što će se ostale komponente prisutne u uzorcima (onečišćenja) razdvojiti na kromatografskoj koloni. Stoga je u ovome istraživanju za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima korištena HPLC metoda.

4.1. Uvođenje metode za određivanje limunske kiseline na HPLC s UV/Vis detektorom

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

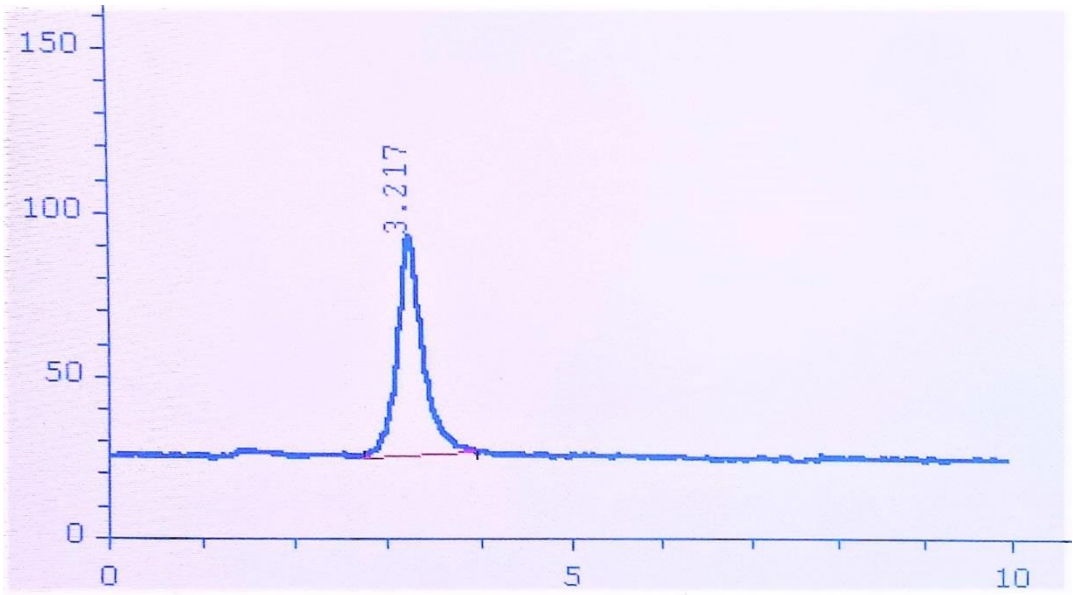
Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8 pripravljena kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode. Budući da je limunska kiselina slaba organska kiselina male molarne mase (M = 192,12 g/mol) i ima polarne skupine, potrebna je 100% vodena mobilna faza kako bi se postiglo odgovarajuće 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). Mobilna faza koja je 100 %-tna vodena otopina te kiselog pH može uzrokovati razdvajanja ugljikovodičnih lanaca stacionarne faze i kolaps kromatografske kolone i tako dovesti do toga da se supstancije ne zadržavaju na koloni. Međutim, tijekom analiza koje su provedene u ovome istraživanju to se nije dogodilo te se takva mobilna faza pokazala učinkovitom. 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 μm; valna duljina detektora, 214 nm i mobilna faza 50 mM fosfatni pufer pH 2,8, protok 0,5 ml/min) dobiven je kromatogram osnovne (bazne) linije prikazan na slici 5.

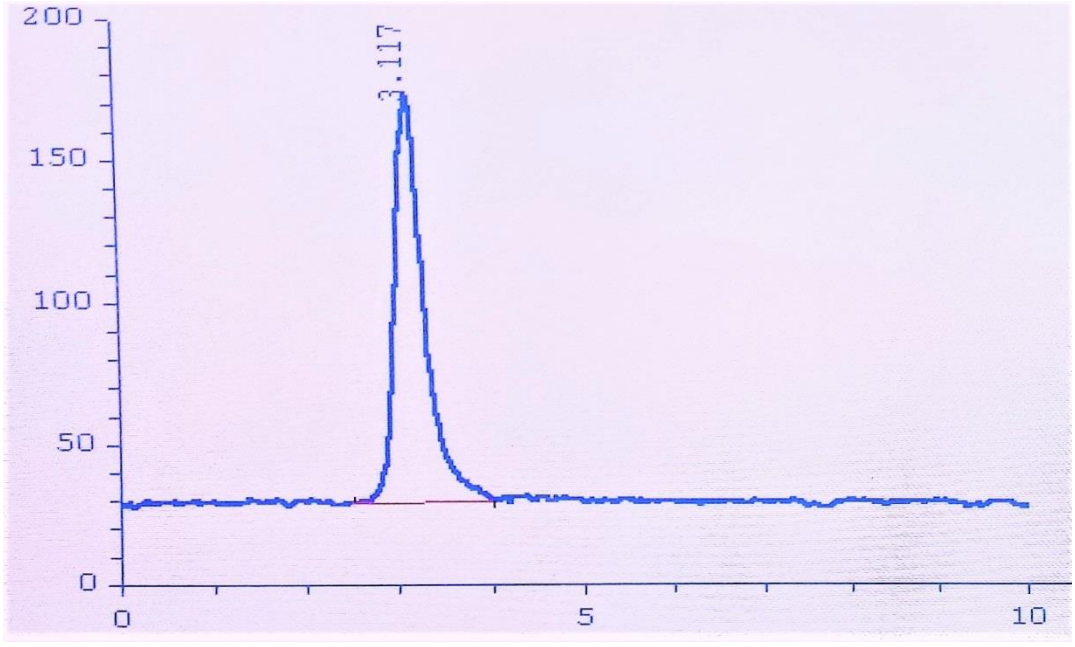


Slika 5. Kromatogram osnovne (bazne) linije dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom

Na slikama 6 i 7 prikazani su kromatogrami standardnih otopina limunske kiseline koncentracija 0,5 g/L i 1,0 g/L dobiveni pri istim navedenim uvjetima mjerenja. Iz prikazanih kromatograma vidljivo je da je vrijeme zadržavanja limunske kiseline na koloni iznosilo oko 3 minute dok je ukupna analiza trajala 10 minuta. Na osnovu vremena zadržavanja limunske kiseline na koloni, 3 minute, i ukupne analize, 10 minuta, može se zaključiti da je metoda brza.



Slika 6. Kromatogram standardne otopine limunske kiseline koncentracije 0,5 g/L dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom



Slika 7. Kromatogram standardne otopine limunske kiseline koncentracije 1,0 g/L dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom

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

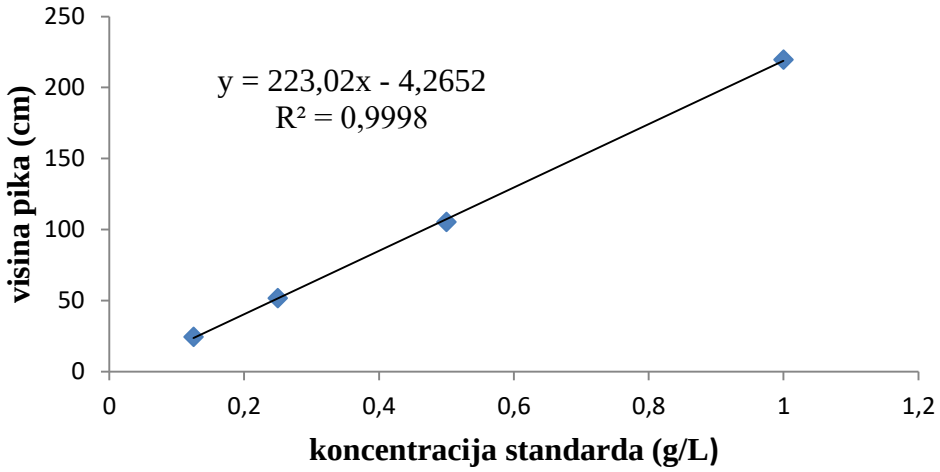
Validacija se definira kao postupak kojim se utvrđuje odgovara li djelotvornost neke metode zahtjevima za određenu analitičku primjenu. Ona jamči da će se u propisanim uvjetima primjene određenog analitičkog postupka dobiti valjani rezultati (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

Prilikom uvođenja metode za određivanje limunske kiseline u voćnim sokovima, metoda je validirana. Za validaciju metode korištene su standardne otopine limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 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), granica dokazivanja i granica određivanja.

4.2.1. Linearnost

Linearnost analitičke metode odražava njezinu sposobnost da unutar određenog intervala rezultati analize budu direktno proporcionalni količini analita prisutnog u uzorku. Linearnost metode se iskazuje koeficijentom korelacije regresijskog pravca, R^2 (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

Za izradu kalibracijske krivulje i provjere linearnosti metode napravljen je niz mjerenja standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Svaka standardna otopina analizirana je najmanje pet puta. Iz više mjerenja izračunata je srednja vrijednost visine analitičkog signala. Kalibracijska krivulja konstruirana je iz ovisnosti srednje vrijednosti visine analitičkog signala i poznate koncentracije standarda limunske kiseline (slika 8). Regresijskom analizom dobivena je jednadžba kalibracijske krivulje $y = 223,02x - 4,2652$ s pripadajućim koeficijentom korelacije $R^2 = 0,9998$.



Slika 8. Baždarni dijagram standardnih otopina limunske kiseline (u koncentracijskom rasponu 0,125 – 1,0 g/L) analiziranih pomoću HPLC s UV/Vis detektorom

Iz dobivene jednadžbe pravca i koeficijenta korelacije može se zaključiti da je metoda u koncentracijskom rasponu 0,125 do 1,0 g/L linearna te se može primijeniti za analizu koncentracije limunske kiseline u nepoznatom uzorku.

4.2.2. Preciznost

Preciznost metode govori o slaganju između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim injektiranjem istog uzorka pri strogo propisanim uvjetima. Kako bi se ispitala preciznost provodi se pet do šest mjerenja na dvije do tri različite koncentracije. Najčešće se izražava kao RSD. Razlikujemo preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (reproducibilnost) (Medić-Šarić i sur., 2006; Nigović i sur., 2014).

U ovom istraživanju za određivanje preciznosti u seriji, odnosno ponovljivosti, korištene su standardne otopine limunske kiseline u koncentracijskom rasponu 0,125 do 1,0 g/L koje su uzastopno (4 do 5 puta) injektirane u HPLC sustav s UV/Vis detektorom. Iz dobivenih vrijednosti izračunata je RSD. U tablici 3 prikazani su rezultati ispitivanja ponovljivosti standarda limunske kiseline koncentracije 0,5 g/L.

Tablica 3. Izmjerene visine pikova standarda limunske kiseline koncentracije 0,5 g/L u kratkom vremenskom intervalu (ispitivanje ponovljivosti)

Standard koncentracije 0,5 g/L	**Visina pika (mAU)**
1. mjerenje	104,549
2. mjerenje	108,638
3. mjerenje	104,222
4. mjerenje	103,157
5. mjerenje	106,649
Srednja vrijednost visine pika (X)	105,443
Standardna devijacija (SD)	2,189654
Relativna standardna devijacija RSD (%)	**2,08**

Na isti način izračunate su RSD vrijednosti za ostale standardne otopine limunske kiseline. U tablici 4 navedene su RSD vrijednosti za preostale tri koncentracije standardnih otopina limunske kiseline.

Tablica 4. Preciznost u seriji dobivena ispitivanjem standardnih otopina limunske kiseline koncentracija 0,125 g/L, 0,25 g/L i 1,0 g/L

Koncentracija standarda limunske kiseline (g/L)	**RSD (%)**
0,125	**2,07**
0,25	**4,87**
1,0	**4,32**

Budući da su vrijednosti RSD dobivene ispitivanjem preciznosti manje od 5 %, može se zaključiti da će uvedena metoda precizno odrediti koncentraciju limunske kiseline u nepoznatom uzorku.

4.2.3. Granica dokazivanja i granica određivanja

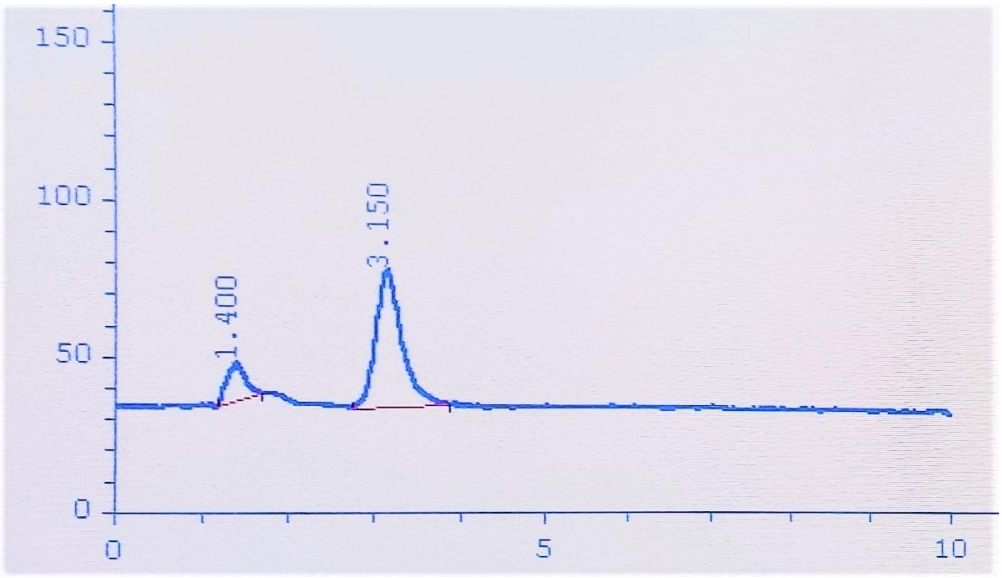
Granica dokazivanja, LOD je najniža koncentracija analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena, a granica određivanja, LOQ predstavlja najmanju količinu analita koju se kvantitativno može odrediti u nekom uzorku s prihvatljivom točnošću i preciznošću (Nigović i sur., 2014). Formule za izračunavanje LOD i LOQ navedene su u poglavlju Uvod.

Iz nagiba kalibracijske krivulje izračunati su LOD i LOQ. Granica dokazivanja iznosi 0,02 g/L, a granica određivanja 0,06 g/L, što pokazuje da je metoda vrlo osjetljiva te da može u nepoznatom uzorku odrediti koncentraciju limunske kiseline od 0,06 g/L.

4.3. Rezultati ispitivanja uzoraka voćnih sokova analiziranih na HPLC s UV/Vis detektorom

Voćni sokovi (n = 5) pripremljeni su za analizu kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode te analizirani pomoću HPLC s UV/Vis detektorom.

Slika 9 prikazuje kromatogram jednog od analiziranih uzoraka voćnoga soka. Budući da se na dobivenom kromatogramu nalazi više od jednog pika (signala), detekcija limunske kiseline izvršena je usporedbom s kromatogramom standardne otopine limunske kiseline. S obzirom da vrijeme zadržavanja limunske kiseline na kromatogramima standardnih otopina iznosi oko 3 minute, može se zaključiti da je drugi, veći, pik na kromatogramu uzorka voćnog soka pik limunske kiseline.



Slika 9. Kromatogram jednog od uzoraka voćnog soka dobiven na HPLC s UV/Vis detektorom

Koncentracija limunske kiseline u voćnim sokovima određena je pomoću prethodno dobivene jednadžbe kalibracijske krivulje, a rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Visina pikova i koncentracija limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova analiziranih na HPLC s UV/Vis detektorom

Uzorci voćnih sokova	**Visina pika (mAU)**	**Koncentracija limunske kiseline u analiziranim razrijeđenim uzorcima (g/L)**	**Koncentracija limunske kiseline u voćnim sokovima (g/L)**
1. Uzorak 1	41,3	**0,204**	**2,04**
2. Uzorak 2	84,5	**0,398**	**3,98**
3. Uzorak 3	38,0	**0,189**	**1,9**
4. Uzorak 4	81,9	**0,386**	**3,86**
5. Uzorak 5	31,1	**0,159**	**1,6**

U svim ispitivanim uzorcima voćnoga soka potvrđeno je prisustvo limunske kiseline. Limunska kiselina utvrđena je u koncentracijskom rasponu od 1,6 g/L (uzorak 5) do 3,98 g/L (uzorak 2).

S obzirom da deklaracije ispitivanih 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.

Usporedbom rezultata dobivenih HPLC analizom za koncentraciju limunske kiseline u analiziranim voćnim sokovima s vrijednostima koje propisuju pravilnici o prehrambenim aditivima, može se zaključiti kako tri ispitana uzorka: uzorak 1, uzorak 3 te uzorak 5 sadrže dozvoljenu količinu limunske kiseline. Međutim, u preostala dva ispitana uzorka (uzorak 2 i uzorak 4) koncentracija limunske kiseline je veća od dozvoljene, odnosno 3,98 g/L i 3,86 g/L. Upravo stoga važno je pratiti koncentraciju limunske kiseline u proizvodima kojima su ljudi svakodnevno izloženi.

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

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- uvedena HPLC-UV/Vis metoda omogućuje brzo, pouzdano i precizno određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima

- u dva ispitana uzorka komercijalno pribavljenih voćnih sokova koncentracija limunske kiseline prelazila je dopuštenu koncentraciju prema propisima EU, što pokazuje da je važno pratiti koncentraciju limunske kiseline u proizvodima namijenjenima konzumaciji ljudi.

6. LITERATURA

Caudarella R, Vescini F. Urinary citrate and renal stone disease: the preventive role of alkali citrate treatment. *Arch Ital Urol Androl*, 2009, 81(3), 182-7.

Kang DE, Sur RL, Haleblian GE, Fitzsimons NJ, Borawski KM, Preminger GM. Long-term lemonade based dietary manipulation in patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *J Urol*, 2007, 177(4), 1358-62.

Kowalski J, Wittrig B. Simple, Reliable HPLC Analyses of Organic Acids Using Water-Compatible Allure or Ultra C18 Columns, 2007, http://www.restek.com, pristupljeno 10.07.2017.

Lerma EV. Hypocitraturia, 2015, http://emedicine.medscape.com, pristupljeno 12.07.2017.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, Postupci odjeljivanja, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012, str. 202-224.

Max B, Salgado JM, Rodriguez N, Cortes S, Converti A, Dominguez JM. Biotechnological production of citric acid. *Braz J Microbiol*, 2010, 41(4), 862-875.

Medić-Šarić M, Jasprica I, Debeljak Ž. Uvod u validaciju metoda analize lijekova. Farmaceutski glasnik, 2006, 62(1), str. 1-7.

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

Penniston KL, Nakada SY, Holmes RP, Assimos DG. Quantitative Assessment of Citric Acid in Lemon Juice, Lime Juice, and Commercially Available Fruit Juice Products. *J Endourol*, 2008, 22(3), 567-570.

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

Pubchem; Citric Acid, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 10.07.2017.

Seltzer MA, Low RK, McDonald M, Shami GS, Stoller ML. Dietary manipulation with lemonade to treat hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol*, 1996, 156(3), 907-9.

Skoog DA, Leary JJ. An introduction of chromatographic separations, U: Principles of Instrumental Analysis. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1992, str. 579-604.

Skoog DA, Leary JJ. High-performance liquid chromatography, U: Principles of Instrumental Analysis. Philadelphia, Saunders College Publishing, 1992, str. 628-669.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. High-Performance Liquid Chromatography, U: Fundamentals of analytical chemistry, 5th edition. New York, Saunders College Publishing, 1988, str. 644-650.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentals of analytical chemistry, 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti V, Živković A. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 693-700.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. High-Performance Liquid Chromatography U: Analytical chemistry: An Introduction, 7th edition. Orlando, Saunders College Publishing, 2000, str. 683-691.

Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol Biotechnol*, 2006, 44, 141-149.

Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F, i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Zagreb, Medicinska naklada, 1997, str. 246-252.

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

Wang YL, Chang CC, Chi CW, Chang HH, Chiang YC, Chuang YC, Chang HH, Huang GF, Liao YS, Lin CP. Erosive potential of soft drinks on human enamel: an in vitro study. *J Formos Med Assoc*, 2014, 113(11), 850-6.

Weikle K. Determination of citric acid in fruit juices using HPLC. *J Anal Chem*, 2012, 3, 57-62.

Wessely K, Zech K. HPLC in Pharmaceutical Analysis. Gmbh Boblingen, Hewlett-Packard 1979, str. 50-55.

Zuckerman JM, Assimos DG. Hypocitraturia: Pathophysiology and Medical Management. *Rev Urol*, 2009, 11(3), 134-144.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Cilj ovoga istraživanja bio je uvesti analitičku metodu koja bi omogućila brzo, pouzdano i precizno određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova. Za određivanje koncentracije limunske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/Vis detektorom. Istraživanje je provedeno na HPLC (Knauer, Berlin, Njemačka) koji se sastojao od izokratne pumpe, UV/Vis detektora, manualnog injektora i analitičke kolone obrnute faze dimenzija 125,0x4,6 mm s punilom veličine 5 μm (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka). Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa. Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru bila je podešena na 214 nm. Iz osnovne matične otopine limunske kiseline (2,0 g/L) razrjeđenjem s MilliQ vodom pripremljen je niz standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Pri opisanim uvjetima na HPLC-UV/Vis vrijeme zadržavanja limunske kiseline na koloni iznosilo je oko 3 minute, a ukupna analiza trajala je 10 minuta. Dobivena kalibracijska krivulja je bila pravac s jednadžbom y = 223,02x - 4,2652 i pripadajućim koeficijentom korelacije R^2 = 0,9998. Ponovljivost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 5% za sve ispitane standardne otopine. Granica dokazivanja bila je 0,02 g/L, a granica određivanja 0,06 g/L, što pokazuje da je metoda vrlo osjetljiva. Mjerenjem koncentracije limunske kiseline u komercijalno pribavljenim uzorcima voćnog soka (n = 5) dobivene su vrijednosti u rasponu od 1,6 g/L (uzorak 5) do 3,98 g/L (uzorak 2) pri čemu je u dva uzorka koncentracija limunske kiseline bila viša od dopuštene (3,0 g/L; Uredba komisije EU br. 1129/2011). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je razvijena metoda brza, pouzdana i precizna te se može koristiti za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova. S obzirom da je u dva uzorka koncentracija limunske kiseline prelazila dopuštenu koncentraciju važno je pratiti njenu koncentraciju u proizvodima namijenjenima konzumaciji ljudi.

The aim of this research was to introduce an analytical method that would allow fast, reliable and precise determination of citric acid concentration in samples of commercially obtained fruit juices. To determine the concentration of citric acid, high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detector was used. This research was conducted on HPLC (Knauer, Berlin, Germany) consisted of isocratic pump, UV/Vis detector, manual injector and reverse phase analytical column (dimension: 125.0 x 4.6 mm, particle size: 5 μm; LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was 50 mM phosphate buffer with pH adjusted to 2.8. The mobile phase flow was 0.5 mL/min and the resulting pressure 16.7 MPa. Wavelength on the UV/Vis detector was set at 214 nm. From the citric acid stock solution (2.0 g/L) by diluting with MilliQ water a set of working standards solutions was prepared in a concentration range of 0.125 to 1.0 g/L. In described HPLC conditions, the citric acid retention time was approximately 3 minutes and the analysis lasted 10 minutes. Calibration curve was linear (equation: $y = 223.02x – 4.2652$; correlation factor: $R^2 = 0.9998$). Repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 5% for all tested working standard solutions. The limit of detection was 0.02 g/L and the limit of quantification was 0.06 g/L, indicating that developed method is very sensitive. The concentration of citric acid in commercially provided fruit juice samples (n = 5) ranged from 1.6 g/L (sample 5) to 3.98 g/L (sample 2). In two samples the concentration of citric acid was higher than 3.0 g/L as recommended by Commission regulation EU No. 1129/2011. From the results it can be concluded that the developed method is fast, reliable and accurate and can be used to determine the concentration of citric acid in fruit juices. Since in two samples of commercially obtained fruit juices citric acid concentration exceed the recommended concentration, it is important to monitor its concentration in products intended for human consumption.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/

BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Optimiziranje metode za određivanje koncentracije limunske kiseline u voćnim sokovima

Katarina Jagić

SAŽETAK

Cilj ovoga istraživanja bio je uvesti analitičku metodu koja bi omogućila brzo, pouzdano i precizno određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima komercijalno pribavljenih voćnih sokova. Za određivanje koncentracije limunske kiseline korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/Vis detektorom. Istraživanje je provedeno na HPLC (Knauer, Berlin, Njemačka) koji se sastojao od izokratne pumpe, UV/Vis detektora, manualnog injektora i analitičke kolone obrnute faze dimenzija 125,0x4,6 mm s punilom veličine 5 µm (LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Njemačka). Mobilna faza bila je 50 mM otopina fosfatnog pufera pH 2,8. Protok mobilne faze bio je podešen na 0,5 mL/min što je stvaralo tlak od 16,7 MPa. Valna duljina detekcije na UV/Vis detektoru bila je podešena na 214 nm. Iz osnovne matične otopine limunske kiseline (2,0 g/L) razrjeđenjem s MilliQ vodom pripremljen je niz standardnih otopina limunske kiseline u koncentracijskom rasponu od 0,125 do 1,0 g/L. Pri opisanim uvjetima na HPLC-UV/Vis vrijeme zadržavanja limunske kiseline na koloni iznosilo je oko 3 minute, a ukupna analiza trajala je 10 minuta. Dobivena kalibracijska krivulja je bila pravac s jednadžbom y = 223,02x - 4,2652 i pripadajućim koeficijentom korelacije R^2 = 0,9998. Ponovljivost izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosila je manje od 5% za sve ispitane standardne otopine. Granica dokazivanja bila je 0,02 g/L, a granica određivanja 0,06 g/L, što pokazuje da je metoda vrlo osjetljiva. Mjerenjem koncentracije limunske kiseline u komercijalno pribavljenim uzorcima voćnog soka (n = 5) dobivene su vrijednosti u rasponu od 1,6 g/L (uzorak 5) do 3,98 g/L (uzorak 2), pri čemu je u dva uzorka koncentracija limunske kiseline bila viša od dopuštene (3,0 g/L; Uredba komisije EU br. 1129/2011). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je razvijena metoda brza, pouzdana i precizna te se može koristiti za određivanje koncentracije limunske kiseline u uzorcima voćnih sokova. S obzirom da je u dva uzorka koncentracija limunske kiseline prelazila dopuštenu koncentraciju važno je pratiti njenu koncentraciju u proizvodima namijenjenima konzumaciji ljudi.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 24 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Limunska kiselina, voćni sokovi, HPLC, validacija, optimiziranje, Uredba komisije EU br. 1129/2011

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

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

Dr. sc. Lovorka Vujić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Development of the method for determination of citric acid in fruit juices

Katarina Jagić

SUMMARY

The aim of this research was to introduce an analytical method that would allow fast, reliable and precise determination of citric acid concentration in samples of commercially obtained fruit juices. To determine the concentration of citric acid, high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis detector was used. This research was conducted on HPLC (Knauer, Berlin, Germany) consisted of isocratic pump, UV/Vis detector, manual injector and reverse phase analytical column (dimension: 125.0 x 4.6 mm, particle size: 5 μm; LiChrospher RP-18, Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was 50 mM phosphate buffer with pH adjusted to 2.8. The mobile phase flow was 0.5 mL/min and the resulting pressure 16.7 MPa. Wavelength on the UV/Vis detector was set at 214 nm. From the citric acid stock solution (2.0 g/L) by diluting with MilliQ water a set of working standards solutions was prepared in a concentration range of 0.125 to 1.0 g/L. In described HPLC conditions, the citric acid retention time was approximately 3 minutes and the analysis lasted 10 minutes. Calibration curve was linear (equation: $y = 223.02x – 4.2652$; correlation factor: $R^2 = 0.9998$). Repeatability expressed as relative standard deviation (RSD) was less than 5% for all tested working standard solutions. The limit of detection was 0.02 g/L and the limit of quantification was 0.06 g/L, indicating that developed method is very sensitive. The concentration of citric acid in commercially provided fruit juice samples (n = 5) ranged from 1.6 g/L (sample 5) to 3.98 g/L (sample 2). In two samples the concentration of citric acid was higher than 3.0 g/L as recommended by Commission regulation EU No. 1129/2011. From the results it can be concluded that the developed method is fast, reliable and accurate and can be used to determine the concentration of citric acid in fruit juices. Since in two samples of commercially obtained fruit juices citric acid concentration exceed the recommended concentration, it is important to monitor its concentration in products intended for human consumption.

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

Thesis includes: 37 pages, 9 figures, 5 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Citric acid, fruit juices, HPLC, validation, optimization, Commission regulation EU No. 1129/2011

Mentor: **Ana-Marija Domijan**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan**, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2017.