Validacija spektroskopskih i kromatografskih metoda za određivanje polifenolnih spojeva

Sabljić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:145977

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marija Sabljić

VALIDACIJA SPEKTROSKOPSKIH I KROMATOGRAFSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

Diplomski rad

Osijek, rujan 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode II
Tema rada je prihvaćena na X sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 18. 06. 2015. godine.
Mentor: izv.prof.dr.sc. *Lidija Jakobek*
Pomoć pri izradi: *Petra Krivak*, dipl.ing.

VALIDACIJA SPEKTROSKOPSKIH I KROMATOGRAFSKIH METODA ZA ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

Marija Sabljić, 269/DI

Sažetak:
U ovom radu provedena je validacija spektroskopskih metoda (metoda za ukupne polifenole (Folin-Ciocalteu metoda), metoda za ukupne flavonoide, metoda za ukupne antocijanine (pH-diferencijalna metoda)) i kromatografske metode za određivanje polifenolnih spojeva. Parametri validacije koji su se određivali bili su: linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost, točnost te osjetljivost. Folin Ciocalteu metoda validirana je za galnu kiselinu, (+)-katehin i kvercetin-3-rutinozid, metoda za ukupne flavonoide za (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin, a metoda za ukupne antocijanine za cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid. Kromatografska metoda validirana je za sve spomenute polifenole. Utvrđeno je da su spektroskopske metode linearne, s prihvatljivim granicama detekcije i kvantifikacije te s prihvatljivom preciznošću i točnošću. Osjetljivost je bila najbolja za standarde polifenola koji se uobičajeno koriste kao standardi: galna kiselina za ukupne polifenole, (+)-katehin za ukupne flavonoide, cijanidin-3-glukozid za ukupne antocijanine. Kromatografska metoda je također dovoljno precizna i točna, s dobrim granicama detekcije, kvantifikacije, linearnošću te s prihvatljivom osjetljivošću.

Ključne riječi: *Validacija, ukupni polifenoli, ukupni flavonoidi, ukupni antocijanini, kromatografska metoda*

Rad sadrži: 33stranice
14slika
6tablica
0 priloga
25literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	prof. dr. sc. *Daniela Čačić Kenjerić*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Lidija Jakobek*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Ivana Flanjak*	član
4.	doc. dr. sc. *Mirna Habuda-Stanić*	zamjena člana

Datum obrane: 16. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry and Instrumental Methods
FranjeKuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Instrumental MethodsII
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X held on June 18th, 2015.
Mentor: *Lidija Jakobek*, PhD, Associate professor
Technical assistance: *Petra Krivak,* BSc

VALIDATION OF SPECTROSCOPIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR POLYPHENOLIC COMPOUND DETERMINATION

Marija Sabljić, 269/DI

Summary:
In this paper, the validation of spectroscopic methods (method for total polyphenols (Folin-Ciocalteu method), method for total flavonoids, method for total anthocyanins (pH differential method)) and chromatographic method for the determination of polyphenol compounds was carried out. Validation parameters which were determined were: linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy and sensitivity. Folin-Ciocalteu method was validated for gallic acid, (+) - catechin and quercetin-3-rutinoside, methods for the total flavonoid content for (+) - catechin, quercetin-3-rutinoside and quercetin and method for total anthocyanins for cyanidin-3- galactoside and cyanidin-3-glucoside. Chromatographic method was validated for all of these polyphenols. It has been shown that spectroscopic methods are linear, with acceptable limits of detection and quantification and with acceptable precision and accuracy. The sensitivity was the best for the polyphenol standards which are commonly used: gallic acid for total polyphenols, (+) - catechin for total flavonoids, cyanidin-3-glucoside for total anthocyanins. Chromatographic method was also sufficiently precise and accurate, with good limits of detection, quantification, linearity and with reasonable sensitivity.

Key words: *Validation,total polyphenols, total flavonoids, total anthocyanins, chromatographic method*

Thesis contains: 33pages
14 figures
6tables
0 supplements
25references
Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, full professor	chair person
2.	*Lidija Jakobek*, PhD, associate professor	supervisor
3.	*Ivana Flanjak*, PhD, assistant professor	member
4.	*Mirna Habuda-Stanić*, PhD, assistant professor	stand-in

Defense date: 16 September, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, FranjeKuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Lidiji Jakobek na predloženoj temi, stručnoj pomoći, savjetima i strpljivosti tijekom provedbe analiza i izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem dipl. ing. Petri Krivak na utrošenom vremenu i strpljivosti tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem voditeljici studija, svim profesorima i asistentima, kolegama i svojoj obitelji na pruženoj potpori i pomoći tijekom studija.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. OSIGURANJE KVALITETE U LABORATORIJU 3

2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA 4

2.3. KRITERIJI VALIDACIJE METODE 7

2.3.1. Kalibracija i linearnost 7

2.3.2. Područje linearnosti 9

2.3.3. Granica detekcije (LOD) 9

2.3.4. Granica kvantifikacije (LOQ) 10

2.3.5. Točnost (istinitost) metode 10

2.3.7. Preciznost 12

2.3.8. Osjetljivost metode 13

3. EKSPERIMENTALNI DIO 13

3.1. ZADATAK RADA 14

3.2. MATERIJALI I METODE 15

3.2.1. Kemikalije 15

3.2.2. Plan istraživanja 15

3.2.3. Priprema standarda i uzoraka 16

3.2.4. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteu metoda) 16

3.2.5. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih flavonoida 17

3.2.6. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina (pH-diferencijalna metoda) 17

3.2.7. Reverzno-fazna visokodjelotvorna tekućinska kromatografija 18

3.2.8. Validacija metoda 19

3.2.9. Statistička obrada podataka 20

4. REZULTATI 20

4.1. KALIBRACIJSKE KRIVULJE STANDARDA ZA SPEKTROSKOPSKE METODE 21

4.2. PARAMETRI VALIDACIJE SPEKTROSKOPSKIH METODA 25

4.3. PARAMETRI VALIDACIJE KROMATOGRAFSKE METODE 27

5. RASPRAVA 27

6. ZAKLJUČCI 30

7. LITERATURA 31

Popis oznaka, kratica i simbola

r^2	Koeficijent determinacije
T	Točnost
I	Iskorištenje
KV	Koeficijent varijacije
SD	Standardno odstupanje
LOD	Granica detekcije (engl. *Limit of detection*)
LOQ	Granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantification*)
DF	Faktor razrjeđenja (engl. *Dilution Factor*)
A	Apsorbancija
ε	Molarni ekstinkcijski koeficijent
MW	Molekulska masa (engl. *Molecular Weigh*)
HPLC	Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)
PTFE	Politetrafluoretilen

1. UVOD

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji se mogu podijeliti prema razlici u kemijskoj strukturi na flavonoide, fenolne kiseline, stilbene i lignane (Manach i sur., 2004). Njihova količina u uzorcima ili model otopinama može se odrediti spektroskopskim metodama kao što su Folin-Ciocalteu metoda za ukupne polifenole, metoda s kompleksacijom flavonoid – aluminijev klorid za ukupne flavonoide te pH-diferencijalna metoda za ukupne antocijanine.

Prednost ovih metoda je što su brze, jednostavne i jeftine pa se često upotrebljavaju za određivanje polifenolnih spojeva. No nedostatak je što spektroskopske metode nisu specifične te se njima određuje količina cijele skupine polifenola u uzorcima, a ne količina pojedinih polifenola. Nadalje, kvantitativni podaci dobivaju se upotrebom kalibracijske krivulje standarda polifenola te se količina polifenola (skupine polifenola) izražava kao ekvivalentna količina tog standarda. Npr. ukupna količina polifenola najčešće se izražava u ekvivalentima galne kiseline, ukupna količina flavonoida u ekvivalentima katehina, a ukupna količina antocijanina u ekvivalentima cijanidin-3-glukozida. Pošto se u ovu svrhu mogu upotrijebiti različiti polifenolni standardi, to može dovesti do razlike u rezultatima te do nemogućnosti usporedbe rezultata. Osim u različitim uzorcima, spektroskopske metode mogu se upotrijebiti i za određivanje količine polifenolnih spojeva u model otopinama npr. u modelu u kojem se prati reakcija jednog polifenolnog spoja. U tom slučaju se za određivanje količine kao standard mora upotrijebiti standard polifenola čija se količina prati. U ovakvoj vrsti mjerenja, spektroskopske metode mogu biti vrlo korisne jer mogu dati precizne podatke, a metode su relativno jednostavne za izvođenje. Da bi se utvrdilo da li su spektroskopske metode pogodne za mjerenje polifenola u uzorcima ili model otopinama, potrebno ih je vrednovati (validirati).

Za razliku od spektroskopskih metoda, metode visokodjelotvorne tekućinske kromatografije služe za određivanje pojedinih spojeva u uzorku, specifične su i osjetljivije, ali najčešće skuplje i vremenski zahtjevne. Koriste se kada je potrebno izvesti specifična mjerenja ili identifikaciju pojedinih spojeva u uzorku ili u model otopinama. Kod kromatografskih tehnika, najuobičajenije je odrediti količinu pojedinog polifenola upotrjebljavajući kalibracijsku krivulju istog polifenolnog spoja. I kromatografske metode se moraju validirati da bi se osigurala točnost dobivenih podataka.

Prilikom validacije spektroskopskih i kromatografskih metoda određuju se parametri kao što su linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, preciznost, točnost i osjetljivost metode (Taverniers i sur., 2004).

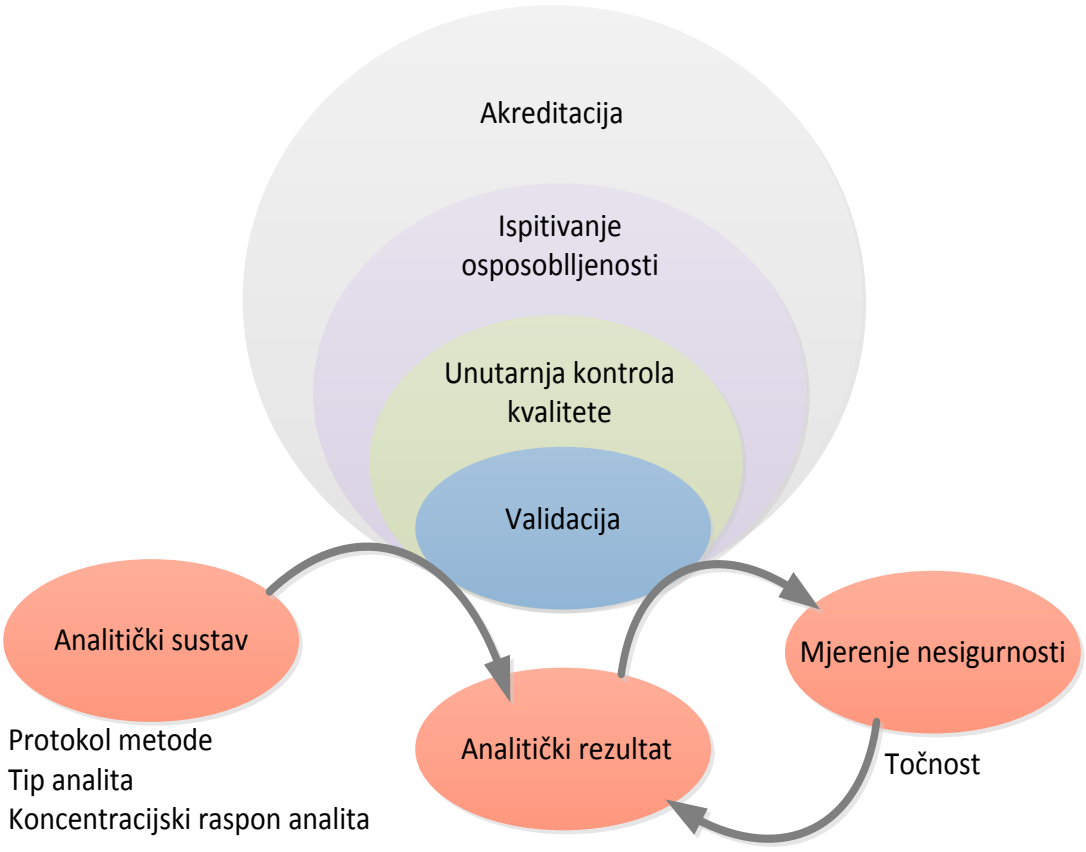
U ovom radu cilj je bio validirati spektroskopske metode i kromatografsku metodu za više polifenolnih spojeva (standarda) s ciljem utvrđivanja njihove pogodnosti za određivanje polifenola u uzorcima ili model otopinama. Validirane su tri različite spektroskopske metode (za određivanje ukupnih polifenola - Folin-Ciocalteu metoda, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijanina - pH-

diferencijalna metoda)) te jedna kromatografska metoda. Određeni su linearnost, granica detekcije i granica kvantifikacije, preciznost i točnost za više različitih polifenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OSIGURANJE KVALITETE U LABORATORIJU

Kako bi laboratorij mogao osigurati kvalitetu dobivenih podataka te kako bi mogao dokazati svoju kompetenciju i izvrsnost, potrebno je validirati analitičke metode koje se izvode u laboratoriju. Validacija metode čini prvi korak u osiguranju kvalitete laboratorija.Osim validacije metoda, u laboratoriju se može provesti i unutarnja kontrola kvalitete pomoćureferentnih materijala, a može se organizirati i sudjelovanje u programu osposobljenosti te akreditacija prema međunarodnim standardima,uglavnom premaISO/IEC 17025 kao što je prikazano na **Slici 1**. Ove različite razine osiguranja kvalitete laboratorij mora poduzeti kako bi bio kvalificiran i kompetentan za provođenje različitih analiza. Validacija metode je potrebna da bi se dokazalo da analitički sustav koji se sastoji od protokola metode, tipa analita i koncentracijskog raspona analita u uzorku odgovara dobivenom analitičkom rezultatu s određenom točnošću (mjerenje nesigurnosti)(Taverniers i sur.,2004).



Slika 1 Različite razine osiguranja kvalitete u laboratorijima (Taverniers i sur.,2004)

U **Tablici 1** nabrojana su regulatorna tijela, agencije za standardizaciju i radne skupine ili povjerenstva koje daju smjernice za različite razine osiguranja kvalitete (Taverniers i sur.,2004).

Tablica 1 Pregled europskih i međunarodnih regulatornih tijela(Taverniers i sur.,2004)

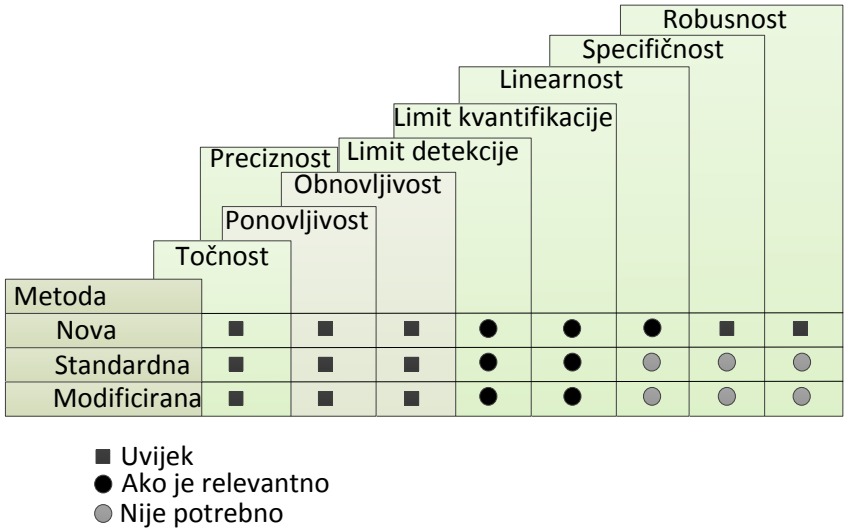
TIJELO	PUNI NAZIV
Eurachem	Europska udruga kemijskih laboratorija
CITAC	Suradnja na međunarodnoj sljedivosti u analitičkoj kemiji
EA	Europska organizacija za akreditaciju
CEN	Europski odbor za normizaciju
IUPAC	Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju
ISO	Međunarodna organizacija za normizaciju
AOAC	Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
USP	Američka farmakopeja
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji
FAO/WHO	Organizacija za hranu i poljoprivredu/Svjetska zdravstvena organizacija
Codex/CCMAS	Codex odbor za metode analize i uzorkovanja
ILAC	Međunarodnaorganizacija za akreditaciju laboratorija

2.2. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

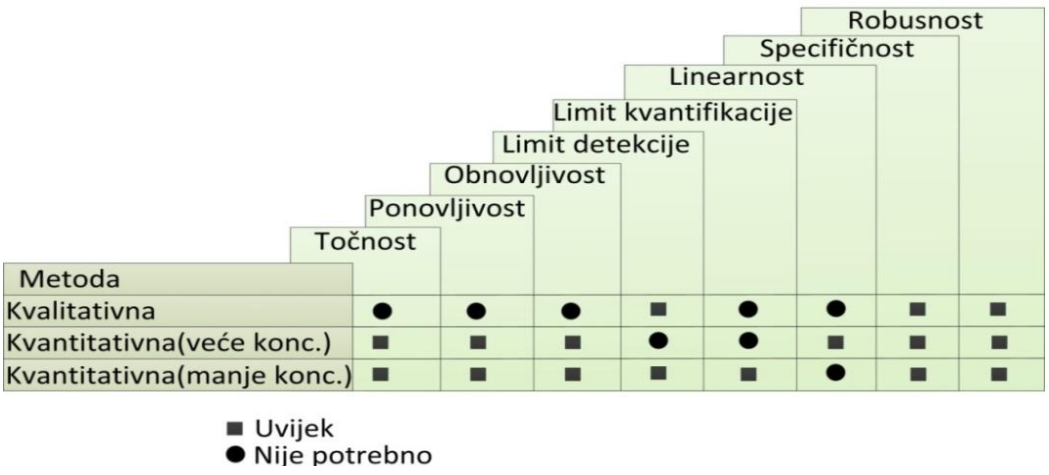
Prema ISO/IEC 17025 standardu validacija se definira kaopostupak pružanja objektivnih dokaza da su zahtjevi koji se stavljaju pred određenu analitičku metodu ispunjeni. Validacija metode je potrebna da bi se potvrdila prikladnost analitičke metode te da bi se dobili kvalitativni i/ili kvantitativni rezultati s prihvatljivom razinom nesigurnosti. U praksi, validacija metode obuhvaća niz kriterija kao što su preciznost, točnost (istinitost), selektivnost/specifičnost, linearnost,granica detekcije (engl. limit of detection, LOD), granica kvantifikacije (engl. limit of quantification, LOQ), osjetljivost, robusnost te kalibracija (Taverniers i sur., 2004). Validacija metode, također, omogućuje laboratorijima i njihovim zaposlenicima veću sigurnost u dobivene rezultate (Magnusson i Örnemark, 2014).

Validacija se provodi kod nenormiranih metoda, metoda koje je razvio laboratorij, kod normiranih metoda koje se koriste izvan predviđenog područja primjene te kod izmjene

normirane metode (Magnusson i Örnemark, 2014). Ona podrazumijeva procjenu učinka metode, različita međulaboratorijska ispitivanja i kontrolu kvalitete kako bi se potvrdila valjanost rezultata ispitivanja. Kriteriji validacije mogu se mijenjati ovisno o namjeni i prirodi metode. Za primjer se može spomenuti „standardne“ i „modificirane“ metode te potpuno nove metode, za koje parametri validacije koje je potrebno ispuniti nisu jednaki što je prikazano na **Slici 2**. Osim toga, parametri serazlikuju ukoliko se radi o kvalitativnoj ili kvantitativnoj metodi (Van Zoonen i sur., 1999).



a)



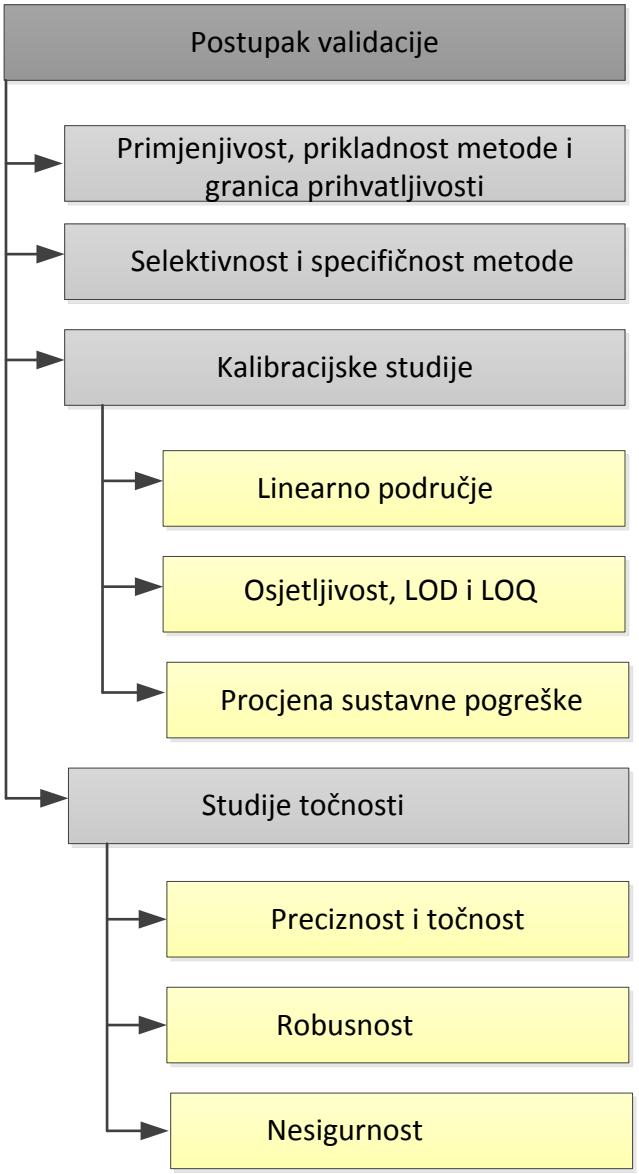
b)

Slika 2 Parametri validacije metoda. a) nova, standardna i modificirana metoda; b) kvalitativna i kvantitativna metoda (Van Zoonen i sur.,1999)

Postupak validacijemože se podijeliti na četiri koraka:

1. određivanje primjenjivosti i prikladnosti metode,
2. određivanje selektivnosti i specifičnosti metode,
3. kalibracijske studije (određivanje linearnog područja, osjetljivosti, LOD, LOQ) i
4. studije točnosti (određivanje preciznosti i točnosti, robusnosti i nesigurnosti),

kao što je prikazano na **Slici 3.**



Slika 3 Postupak validacije metode(Gonzalez i Herrador, 2007)

„Zlatnim standardom“ za validaciju analitičkih metoda smatra se norma ISO 5725, a govori o osnovnim metodama procjene istinitosti i preciznosti (Van der Voet i sur., 1999).

2.3. KRITERIJI VALIDACIJE METODE

Kriteriji za validaciju metode su sljedeći:

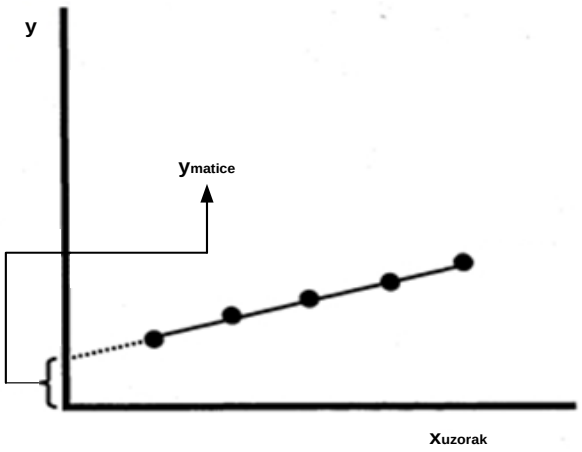
- kalibracija i linearnost,
- područje linearnosti,
- granica detekcije,
- granica kvantifikacije,
- točnost (istinitost),
- preciznost i
- osjetljivost(Thompson i sur., 2002; Taverniers i sur., 2004; Huber, 2007).

2.3.1. Kalibracija i linearnost

Cilj kalibracije je uspostava odnosa između nekoliko poznatih koncentracija standarda ili referentnog materijala i njihovih odgovarajućih signala, čime se kao odgovor dobije kalibracijska krivulja (**Slika 4**) (Cuadros-Rodriguez i sur., 2001).

Kalibracijska krivulja, prema tome, predstavlja odnos analitičkog signala (odgovora) i koncentracije standarda (Gonza´lez i Herrador, 2007). Može se koristiti za dobivanje koncentracije analita u realnim uzorcima (Cuadros-Rodriguez i sur., 2001.). Kalibracija se provodi upotrebom standarda kojemu su poznate vrijednosti koncentracije i mjerenjem odziva instrumenta (Gonza´lez i Herrador, 2007).

Kalibracijska krivulja može biti linearna ili nelinearna. U analitičkim istraživanjima odziv je najčešće linearan te se dobije linearna kalibracijska krivulja (Gonza´lez i Herrador, 2007).



Slika 4 Kalibracijska krivulja uzorka (Cuadros-Rodriguez i sur., 2001)

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Na dijagram se ucrtava analitički signal (y-os) i odgovarajuća koncentracija (x-os)(Gonza´lez i Herrador, 2007). Linearnost se procjenjuje metodom najmanjih kvadrata preko koeficijenta determinacije r^2. Ako je r^2 blizu 1, to znači da točke savršeno pristaju pravcu (Araujo, 2009). Time se dobiva jednadžba pravca prikazana u **formuli 1**:

$$y = \alpha x + \beta \qquad \textbf{(1)}$$

gdje je: y – analitički signal,

x – koncentracija standarda ili referentnog materijala,

α – nagib i

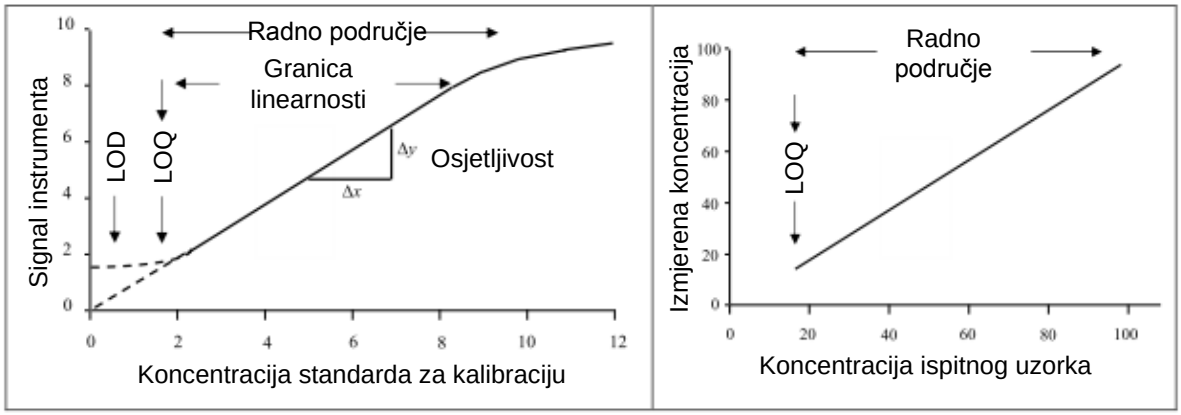
β – odsječak na y – osi (Zwanziger i sur., 1998; Arauju, 2009; Gonza´lez i Herrador, 2007).

Standardi koji se koriste za kalibracijuanalitičkih metoda su najčešće referenti materijalikoji moraju biti homogeni i stabilni (Cuadros-Rodriguez i sur., 2001).Podaci dobiveni kalibracijskom krivuljom mogu se koristiti za određivanje preciznosti, granice detekcije i granice kvantifikacije (Ahuja i Seypinski, 2011).

2.3.2. Područje linearnosti

Područje linearnosti je raspon koncentracija/količine analita u kojem metoda daje odziv proporcionalan koncentraciji analita tj. linearan odziv, ili u kojem se linearna kalibracijska krivulja može primijeniti s poznatom razinom sigurnosti. Područje linearnosti kreće se od granice kvantifikacije (LOQ) do granice u kojem odnos koncentracije i odziva više nije linearan kao što je vidljivo na **Slici 5 (a)**.

Radni raspon je područje unutar kojega metoda daje rezultate s prihvatljivom razinom nesigurnosti. Radno područje instrumenta prikazano je na **Slici 5 (a)**, a podrazumijeva ovisnost koncentracije kalibracijskih standarda i signala koje daje instrument, dok radno područje metode **(Slika 5b)** prikazuje grafičku ovisnost koncentracije poznatog uzorka za ispitivanje i izmjerene koncentracije (Magnusson i Örnemark, 2014).



a) b)

Slika 5 Raspon područja linearnosti.a) krivulja odziva dobivena instrumentalnom metodom; b) pravac dobiven mjernim postupkom (Magnusson i Örnemark, 2014)

2.3.3. Granica detekcije (LOD)

LOD se definira kaonajmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati (Taverniers i sur.,2004.), a izražava se u jedinicama u kojima je izražen i analit (AOAC, 1998). LOD se može izračunati preman **formuli (2):**

$$LOD = 3{,}3\frac{SD}{S} \qquad \textbf{(2)}$$

gdje je: *LOD* – granica detekcije (mg dm^{-3}),

SD – standardna devijacija odsječka na y-osi i

S – nagib kalibracijske krivulje(AOAC, 1998).

LOD se može izračunati i na temelju omjera signala i šuma. On se može primijeniti za analitičke postupke sa baznom linijom pri čemu se uspoređuju signali uzorka poznate koncentracije analita sa signalom slijepog pokusa. Pri tome se određuje minimalna koncentracija pri kojoj se analit može detektirati (Lazarić, 2002).

2.3.4. Granica kvantifikacije (LOQ)

LOQ je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću točnost i preciznost, a kao i LOD se izražava se u jedinicama u kojima je izražen i analit (AOAC, 1998).LOQ se može odrediti prema **formuli (3)**:

$$LOQ = 10\frac{SD}{S} \quad \textbf{(3)}$$

gdje je: *LOQ* – granica kvantifikacije (mg dm^{-3}),

SD – standardna devijacija odsječka na y-osi i

S – nagib kalibracijske krivulje (AOAC, 1998).

LOQ je po svojem iznosu uvijek veća od LOD (Taverniers i sur., 2004).

LOQ se također kao i LOD može izračunati i na temelju omjera signala i šuma za analitičke postupke sa baznom linijom. Pri tome se uspoređuju signali uzorka poznate koncentracije analita sa signalom slijepog pokusa, te se određuje minimalna koncentracija pri kojoj se analit može detektirati (Lazarić, 2002).

2.3.5. Točnost (istinitost) metode

Točnost (istinitost) metode se definira kao podudarnost između srednje vrijednosti dobivene iz velikog broja rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Točnost se smanjuje ukoliko dolazi do povećanja sustavnih pogrešaka. Sustavne pogreške (**Slika 6**) se određuju usporedbom odgovora metode na referentni materijal poznate vrijednosti, a one mogu biti laboratorijske pogreške i/ili pogreške metode te pogreške zbog utjecaja matice (Wood i sur., 1999).

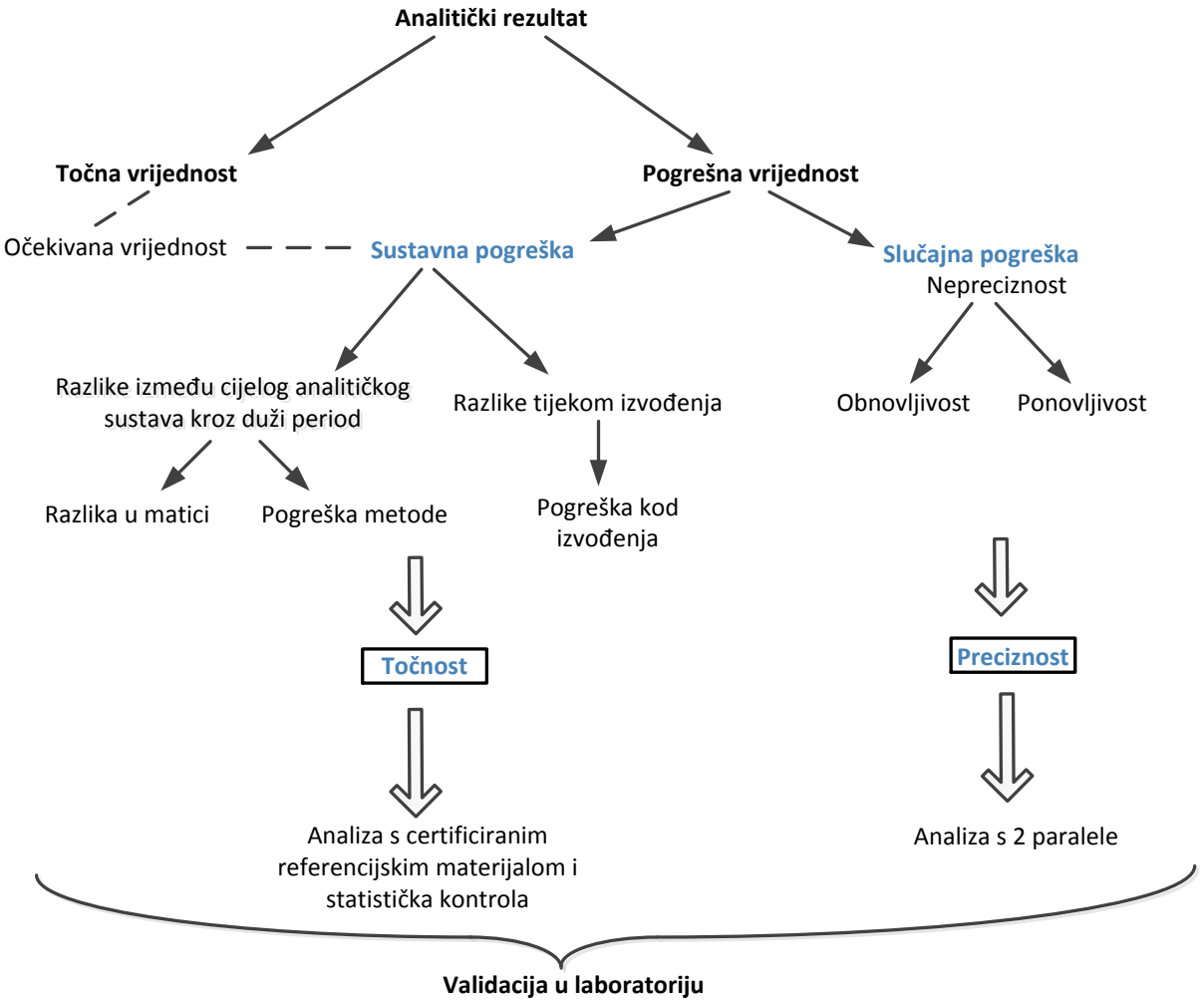
Točnost se može izračunati prema **formuli (4)**:

$$T = \frac{\gamma_c}{\gamma_r} \times 100 \qquad \textbf{(4)}$$

gdje je: T – točnost (%),

γ_c–izmjerena koncentracija standarda (mg dm^{-3}) i

γ_r – stvarna koncentracija standarda (mg dm^{-3}).



Slika 6 Moguće pogreške kod dobivanja analitičkog rezultata (Taverniers i sur., 2004)

Ako se točnost ne određuje s referentnim materijalima, tada se ona izražava kao iskorištenje. Iskorištenje se definira kao postotak stvarne koncentracije analitakoja je izmjerenas

analitičkom metodom. Može se definirati i kao procjena sustavne pogreške analitičkog procesa (Gonza´lez i Herrador, 2007).

Iskorištenje se često primjenjuje kao zaseban parametar validacije. Kod mjerenja iskorištenja dobivene vrijednosti trebaju biti u skladu s prihvatljivim postotkom iskorištenja koje je propisano od strane „Međunarodnog udruženja službenih analitičkih kemičara“ (Taverniers i sur., 2004).

Iskorištenje se može odrediti prema **formuli (5)**:

$$I = \left(\frac{\gamma_1 - \gamma_2}{\gamma_3}\right) \times 100 \qquad \textbf{(5)}$$

gdje je: I – iskorištenje (%)

γ_1 – izmjerena koncentracija analita u uzorku s dodanim analitom (mg dm^{-3}),

γ_2 – izmjerena koncentracija analita u uzorku bez dodanog analita (mg dm^{-3}) i

γ_3 – poznata koncentracija dodanog analita u uzorak (mg dm^{-3}).

2.3.7. Preciznost

Preciznost se definira kao slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje, razlikuju se:

- ponovljivost,
- međupreciznost i
- obnovljivost (Currie i Svehla, 2004).

Ponovljivost podrazumijeva izvođenje analize unutar jednog laboratorija, s istim analitičarom i aparaturom, kroz kraće vremensko razdoblje.Međupreciznost se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem vremenskom razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (analitičari, instrumenti, reagensi). Obnovljivostuključuje izvođenje analiza u više različitih laboratorija s različitim instrumentima i analitičarima.

Preciznost se izražava pomoću standardne devijacije, relativne standardne devijacije, koeficijenta varijacije, granice ponovljivosti ili intervala pouzdanosti (Taverniers i sur., 2004).

Koeficijent varijacije može se odrediti prema **formuli(6)**:

$$KV = \frac{SD}{X} \times 100 \quad \textbf{(6)}$$

gdje je: *KV* - koeficijent varijacije (%),

SD– standardna devijacija rezultata mjerenja i

x – srednja vrijednost mjerenja.

2.3.8. Osjetljivost metode

Osjetljivost metodepredstavlja nagib kalibracijske krivulje. Ona se koristi kod izračuna LOD i LOQ. Metoda se smatra osjetljivom ukoliko mala promjena u koncentraciji ili količini analita uzrokuje značajne promjene u mjernom signalu. Osjetljivost se ne spominje uvijek kao parametar validacije jer obično ovisi o postavkama instrumenta (Taverniers i sur., 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

U ovom radu zadatak je bio validirati spektroskopske metode za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteau metoda), ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina te kromatografsku metodu za određivanje polifenola. Parametri validacije koji su se određivali su:

-linearnost,

-granica detekcije,

-granica kvantifikacije,

-točnost (istinitost),

-preciznost i

-osjetljivost.

Metoda za ukupne polifenole validirana je za standarde galnu kiselinu, (+)-katehin i kvercetin-3-rutinozid, metoda za ukupne flavonoide za (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin, a metoda za ukupne antocijanine za cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid. Reverzno-fazna visokodjelotvorna tekućinska kromatografija(RP-HPLC) validirana je za galnu kiselinu, (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin, cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid.

Osim toga, zadatak je bio usporediti spektroskopske i kromatografske metode sa stajališta validacijskih parametara te utvrditi da li su spektroskopske metode pogodne za određivanje pojedinih polifenolnih spojeva u model otopinama.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Kemikalije

U istraživanju su korišteni polifenolni standardi proizvođača Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) (galna kiselina (≥ 98%), (+)-katehin hidrat (≥ 98%), kvercetin-3-rutinozid (≥ 95%), kvercetin dihidrat (≥ 98%)), te proizvođača Extrasynthese (Genay, Francuska) (cijanidin-3-galaktozid klorid (ideain chloride, ≥ 97%), cijanidin-3-glukozid klorid (kuromanin chloride, ≥ 96)). Ostale kemikalije proizvedene su u Kemika (Zagreb, Hrvatska) (aluminijev klorid, Folin-Ciocalteau reagens, natrijev hidroksid, natrijev nitrit, natrijev karbonat, kalijev klorid, natrijev acetat). Korišteni metanol je HPLC čistoće.

3.2.2. Plan istraživanja

Spektroskopske metode koje su odabrane za validaciju su: metoda za ukupne polifenole (Folin-Ciocalteau metoda), metoda za ukupne flavonoide te metoda za ukupne antocijanine. Polifenolni standardi su analizirani ovim spektroskopskim metodama u određenom rasponu koncentracija te su pripremljene kalibracijske krivulje i određeni su linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije i osjetljivost. Za određivanje preciznosti i točnosti korišteni su uzorci vina koji su mjereni više puta sa sve tri spektroskopske metode kako bi se dobili rezultati za određivanje preciznosti. U vino su dodavane poznate količine polifenolnih standarda, uzorci su mjereni spektroskopskim metodama, a rezultati su korišteni za određivanje točnosti.

Metoda za reverzno-faznu visokodjelotvornu tekućinsku kromatografiju (RP-HPLC) kojom se polifenolni spojevi iz jabuke i vina mogu razdvojiti (Jakobek i i Barron, 2016), validirana je za nekoliko polifenolnih standarda. Polifenolni standardi su analizirani u određenom rasponu koncentracija te su pripremljene kalibracijske krivulje. Određena je linearnost, granica detekcije, granica kvantifikacije i osjetljivost. RP-HPLC metodom mjereni su ekstrakti kore jabuka i vina u više ponavljanja, a rezultati su korišteni za dobivanje preciznosti. U ekstrakt kore jabuka i vina dodavani su standardi polifenola, uzorci su analizirani RP-HPLC metodom, a rezultati su upotrijebljeni za određivanje točnosti metode.

3.2.3. Priprema standarda i uzoraka

Pripremljene su stock otopine polifenolnih standarda u metanolu (galna kiselina, (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin 1000 mg dm^{-3}) i u metanolu zakiseljenom s HCl-om 0,1 % (cijanidin-3-galaktozid 485 mg dm^{-3} i cijanidin-3-glukozid 480 mg dm^{-3}). Stock otopine su razrijeđene (1, 10, 50, 100, 200, 500 mg dm^{-3} galna kiselina, (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin; 0,96, 9,6 i 48 mg dm^{-3} cijanidin-3-glukozid; 0,97, 9,7 i 48,5 mg dm^{-3} cijanidin-3-galaktozid). Razrijeđene otopine mjerene su spektroskopskim i RP-HPLC metodom.

Vino (Merlot) je razrijeđeno 1 : 1 (*V:V*) s destiliranom vodom za analizu ukupnih polifenola. Za analizu ukupnih flavonoida vino je razrijeđeno 1:10 (*V:V*) s destiliranom vodom.

Prije analize na RP-HPLC uređaju, vino je razrijeđeno 1 : 1 (*V:V*) s destiliranom vodom i filtrirano kroz 0,45 μm PTFE (politetrafluoretilen) filter.Uzorci kore jabuka (Crvenka i Božićnica) dobiveni su guljenjem jabuka (otprilike 1 kg), homogenizacijom kore pomoću miksera za kavu te pripremom ekstrakta. Izvagano je 0,2 g homogeniziranog uzorka te je ekstrakcija provedena s 5 cm^3 metanola zakiseljenog s HCl-om 0,1 % u ultrazvučnoj kupelji, 15 min. Nakon nekoliko minuta, ekstrakt je odekantiran, a ostatak je ekstrahiran još jednom s 2 cm^3 metanola zakiseljenog s HCl-om 0,1 % u ultrazvučnoj kupelji, 15 min. Dva ekstrakta su spojena. Pripremljena su dva paralelna uzorka za svaki kultivar jabuke. Ekstrakti su prije analize na HPLC-u filtrirani kroz 0,45 μm PTFE filter.

3.2.4. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteu metoda)

Spektroskopska Folin-Ciocalteu metoda za ukupne polifenole (Singleton i sur., 1999). validirana je za standarde: galnu kiselinu, (+)-katehin i kvercetin-3-rutinozid. U staklenu kivetu otpipetirano je 0,02 cm^3 polifenolnog standarda, 1,580 cm^3 destilirane vode, 0,1 cm^3 Folin-Ciocalteu reagensa te 0,3 cm^3 otopine natrijevog karbonata (200 g dm^{-3}). Otopina je promiješana i stavljena u vodenu kupelj na 40°C kroz 30 minuta. Nakon toga apsorbancija*A*je mjerena na spektrofotometru (UV 2005, Selecta, Španjolska) na 765 nm prema slijepoj probi koja je umjesto 0,02 cm^3 standarda sadržavala destiliranu vodu. Polifenolni standardi mjereni su dva puta (n=2). Uzorci vina mjereni su istim postupkom šest puta (n=6).

3.2.5. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih flavonoida

Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih flavonoida provedena je prema Mengcheng i sur., 1999, a validirana je za (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin. U staklenu kivetu dodano je 0,8 cm^3 destilirane vode, 0,2 cm^3 polifenolnog standarda i 0,06 cm^3 $NaNO_2$ (5 %). Nakon 5 minuta trajanja reakcije dodano je 0,06 cm^3 $AlCl_3$ (10 %). Nakon 6 minuta dodano je 0,4 cm^3 NaOH (1 M). Razvija se ružičasta boja reakcijske otopine i mjerena je apsorbancija na spektrofotometru na 510 nm prema slijepoj probi koja je umjesto 0,2 cm^3 standarda sadržavala destiliranu vodu. Polifenolni standardi mjereni su dva puta (n=2). Uzorci vina mjereni su istim postupkom šest puta (n=6).

3.2.6. Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina (pH-diferencijalna metoda)

Metoda za ukupne antocijanine (pH-diferencijalna spektroskopska metoda) (Tonutare i sur., 2014) validirana je za cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid. Ova metoda provodi se sa puferom kalijevog klorida pH=1,0 (1,86 g KCl u 1 dm^3 destilirane vode, pH vrijednost je namještena na 1,0 s koncentriranom HCl) i puferom natrijevog acetata pH=4,5 (54,43 g $CH_3CO_2Na \cdot 3\ H_2O$ u 1 dm^3 destilirane vode, pH vrijednost namještena na 4,5 s koncentriranom HCl). Mjerenje je provedeno na način da je u staklenu kivetu dodavano 500 µl standarda antocijanina različitih koncentracija i 1,5 cm^3 pufera pH=1,0. U drugu staklenu kivetu dodavano je 0,5 cm^3 standarda antocijanina različitih koncentracija i 1,5 cm^3 pufera pH=4,5. Faktor razrjeđenja izračunat je prema **formuli (7),** a iznosio je4.

$$DF = \frac{V_1}{V_2} \qquad \textbf{(7)}$$

gdje je: *DF* – faktor razrjeđenja,

V_1 – ukupan volumen (µl) i

V_2– volumen standarda (µl).

Nakon 15 minuta stajanja na tamnom mjestu, mjerena je apsorbancija na 510 i 700 nm na spektrofotometru prema slijepoj probi koja je umjesto uzorka sadržavala destiliranu vodu. Apsorbancija uzorka izračunata je prema **formuli (8)**:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\,1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\,4,5} \qquad \textbf{(8)}$$

gdje je: *A* – apsorbancija uzorka (standarda polifenola),

A_{510} – apsorbancija mjerena na 510 nm i

A_{700}– apsorbancija mjerena na 700 nm.

Polifenolni standardi mjereni su dva puta (n=2). Uzorci vina mjereni su istim postupkom četiri puta (n=4).

Konstruirane su kalibracijske krivulje cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-galaktozida koje su korištene za određivanje količine ukupnih antocijanina u vinu.

Pošto se pH diferencijalnom metodom mogu određivati ukupni antocijanini bez upotrebe kalibracijskih krivulja, prema formuli koja koristi molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida, koncentracija ukupnih antocijanina u vinu računata je i pomoću navedene formule.

$$\gamma = (A \times M \times DF \times 1000)/\varepsilon \quad \textbf{(9)}$$

gdje je: γ-koncentracija antocijanina izražena kao ekvivalent cijanidin-3-glukozid (mg dm^{-3}),

A– apsorbancija,

M – molekulska masa cijanidin-3-glukozida (mol dm^{-3}),

DF – faktor razrjeđenja i

ε – molarni koeficijent apsorpcije koji iznosi 26900 l mol^{-1} cm^{-1}.

3.2.7. Reverzno-fazna visokodjelotvorna tekućinska kromatografija

Kromatografske analize su provedene pomoću ProStar analitičkog HPLC sustava (Varian, USA - ProStar pumpa i ProStar 330 PDA detektor). Kromatografska separacija je izvedena pomoću Omnispher C18 kolone (5 µm, 250 x 4,6 mm i.d., Varian, USA), uz pretkolonu (Chromosep, 1cm x 3 mm, Varian, USA). U gradijentnoj metodi korištena je mobilna faza A (0,5 % H_3PO_4) i mobilna faza B (100 % metanol). Početni postotak mobilne faze B bio je 5 % i povećavao se linearno do 25% (5-a min), do 34 % (14-a min), do 37 % (25-a min), do 40% (30-a min), do 49% (34-a min), do 50% (35-a min), do 51% (58-a min), do 55 % (60-a min), do 80% (62 min), 80 % (65-a min), do 5 % (67 min), 5% (72 min). Protok je bio 0,8 ml min^{-1}. Volumen injektiranih uzoraka i standarda bio je 0,02 cm^3. Kromatogrami su snimani u području od 200 do 600 nm. Galna kiselina praćena je na 260 nm, (+)-katehin na 280 nm, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin na 360 nm, a derivati cijanidina na 460 nm. Konstruirane su kalibracijske krivulje na navedenim valnim duljinama koje su se koristile za određivanje linearnosti, LOD, LOQ i osjetljivosti.Identifikacija polifenola (galna kiselina, (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid,

kvercetin, cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid) iz kore jabuka i vinuizvedena je usporedbom spektara i retencijskih vremena pikova standarda i pikova u ekstraktima kore jabuka (Jakobek i Barron, 2016) i vinu. Kvantifikacija je izvršena pomoću kalibracijskih krivulja standarda polifenola. Određene količine koristile su se za ispitivanje preciznosti i točnosti metode.

3.2.8. Validacija metoda

Kalibracijske krivulje konstruirane su mjerenjem različitih koncentracija polifenolnih standarda te stavljanjem u odnos koncentracije i odziva instrumenta (apsorbancija kod spektroskopskih metoda, površina kod kromatografske metode). Za svaki polifenolni spoj konstrurirane su dvije kalibracijske krivulje.

Linearnost je procijenjena određivanjem koeficijenta determinacije r^2.

LOD i LOQodređeni su prema **formulama (2)** i **(3)**.

Preciznost spektroskopskih metoda određena je mjerenjem uzoraka vina pomoću tri spektroskopske metode, računanjem koncentracije pomoću svakog standarda polifenola te računanjem standardnog odstupanja (SD) prema **formuli (10)**, relativnog standardnog odstupanja (RSD) prema **formuli (11)** te koeficijenta varijacije (KV) prikazanog **formulom (6)**. Za ukupne polifenole i ukupne flavonoide mjerenje je izvršeno 6 puta, a za ukupne antocijanine 4 puta.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}} \qquad \textbf{(10)}$$

gdje je: SD – standardna devijacija,

n –broj ponavljanja,

x_i – rezultat pojedinačnog mjerenja i

$\bar{x}$–srednja vrijednost rezultata mjerenja.

$$\mathrm{RSO} = \left(\frac{SD}{\bar{x}}\right) 10^{z}\ \mathrm{z} = 2, \mathrm{RSO}\ (\%) \qquad \textbf{(11)}$$

gdje je: RSO – relativno standardno odstupanje (%),

SD – standardna devijacija i

$\overline{x}$ – srednja vrijednost rezultata mjerenja.

Preciznost RP-HPLC metode određena je mjerenjem ekstrakta kore jabuke i vina na HPLC uređaju, identifikacijom i kvantifikacijom polifenola te računanjem standardnog odstupanja (SD), relativnog standardnog odstupanja (RSD) te koeficijenta varijacije. Uzorci dva kultivara jabuka pripremljeni su u dvije paralele i mjereni jednom na HPLC uređaju (n=2 svaki kultivar). Vino je pripremljeno u dvije paralele i mjereno jednom na HPLC uređaju (n=2).

Točnost je određena dodavanjem polifenolnih spojeva (100 mg dm^{-3} za ukupne polifenole, 100 mg dm^{-3} za ukupne flavonoide, 48 mg dm^{-3} za ukupne antocijanine) u uzorke vina, analizom pomoću metode za ukupne polifenole, ukupne flavonoide i ukupne antocijanine te računanjem iskorištenja prema **formuli (12)**:

$$I = \left(\frac{\gamma_1 - \gamma_2}{\gamma_3}\right) \times 100 \qquad \textbf{(12)}$$

gdje je: *I* – iskorištenje (%),

γ_1 – izmjerena koncentracija polifenola u uzorku s dodanim polifenolom (mg dm^{-3}),

γ_2 – izmjerena koncentracija polifenola u uzorku (mg dm^{-3}) i

γ_3 – poznata koncentracija dodanog polifenola u uzorak (mg dm^{-3}).

Uzorci su mjereni dva puta.

Kod određivanja točnosti RP-HPLC metode, polifenoli su dodavani u ekstrakt kore jabuka i vino u količini od 25 mg dm^{-3}. Izračunato je iskorištenje.

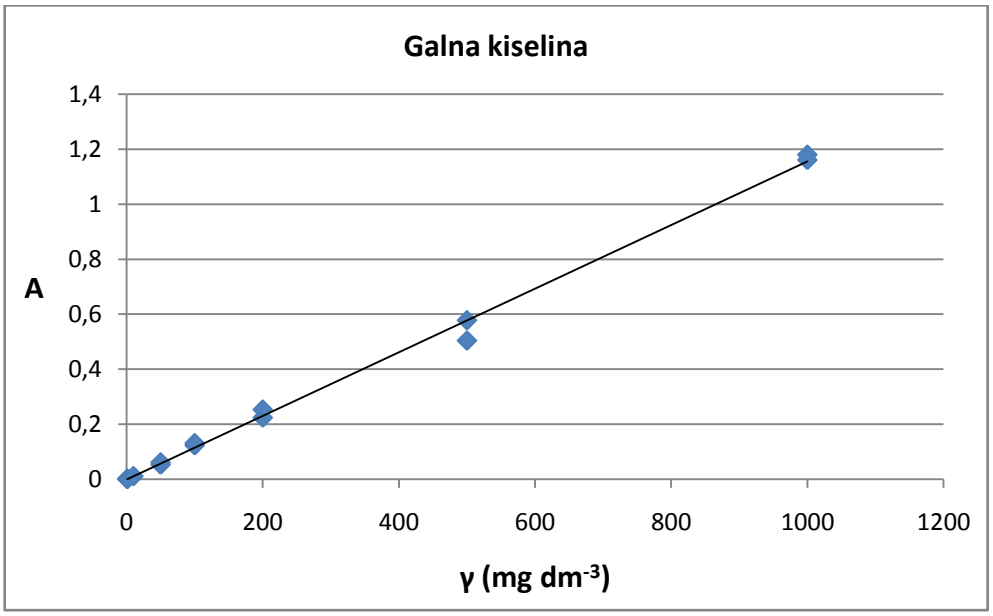
3.2.9. Statistička obrada podataka

Za obradu dobivenih podataka korišten je kompjutorski program MS Excel (Microsoft Corporation, SAD). Pomoću regresijske analize dobivene su jednadžbe pravca i pripadajući koeficijenti determinacije r^2.

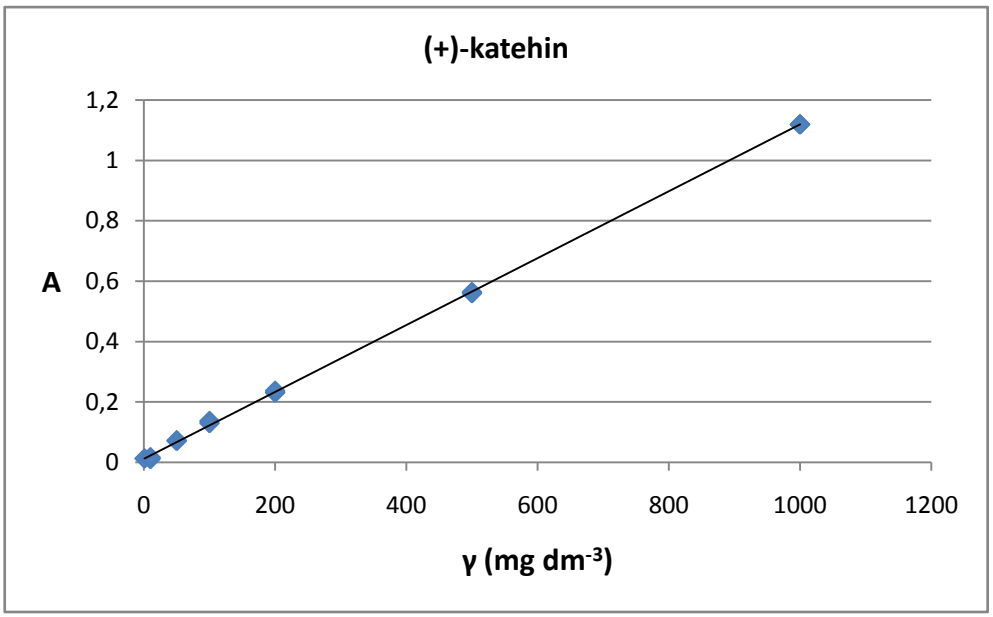
4. REZULTATI

4.1. KALIBRACIJSKE KRIVULJE STANDARDA ZA SPEKTROSKOPSKE METODE

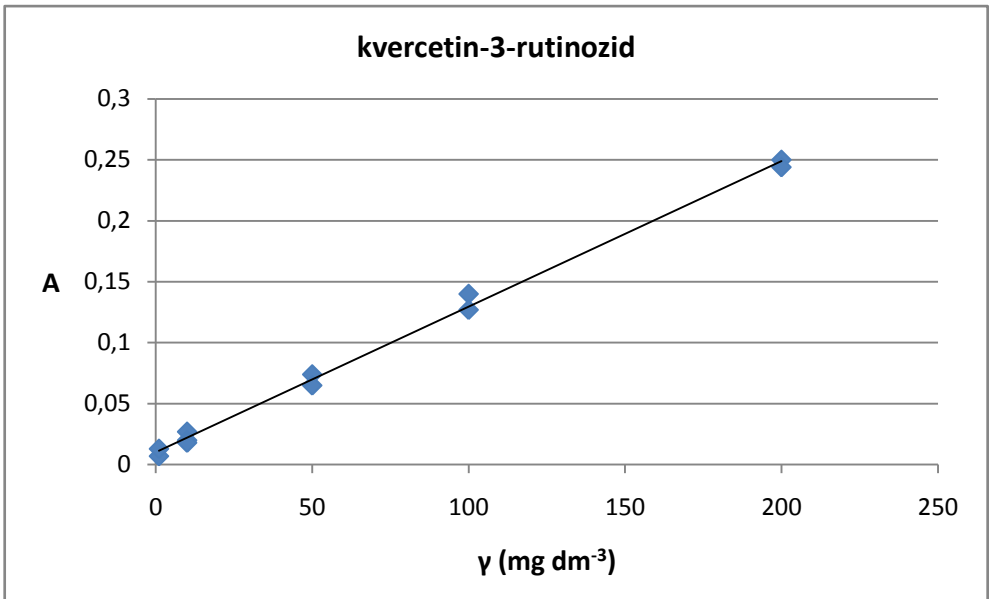
4.1.1.Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih polifenola



Slika 7 Kalibracijska krivulja galne kiseline dobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteau metoda). Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

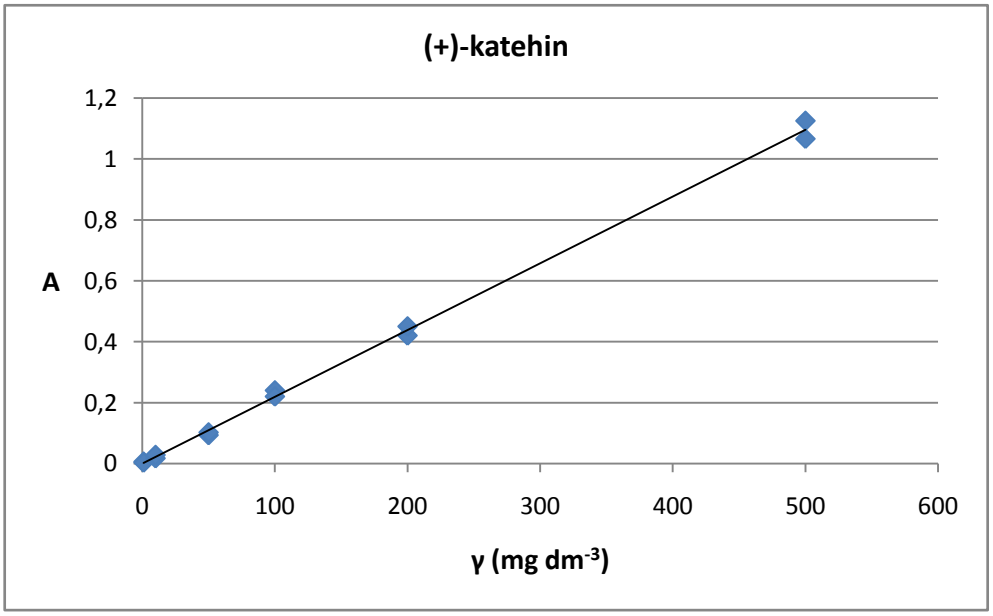


Slika 8 Kalibracijska krivulja (+)-katehina dobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteau metoda). Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

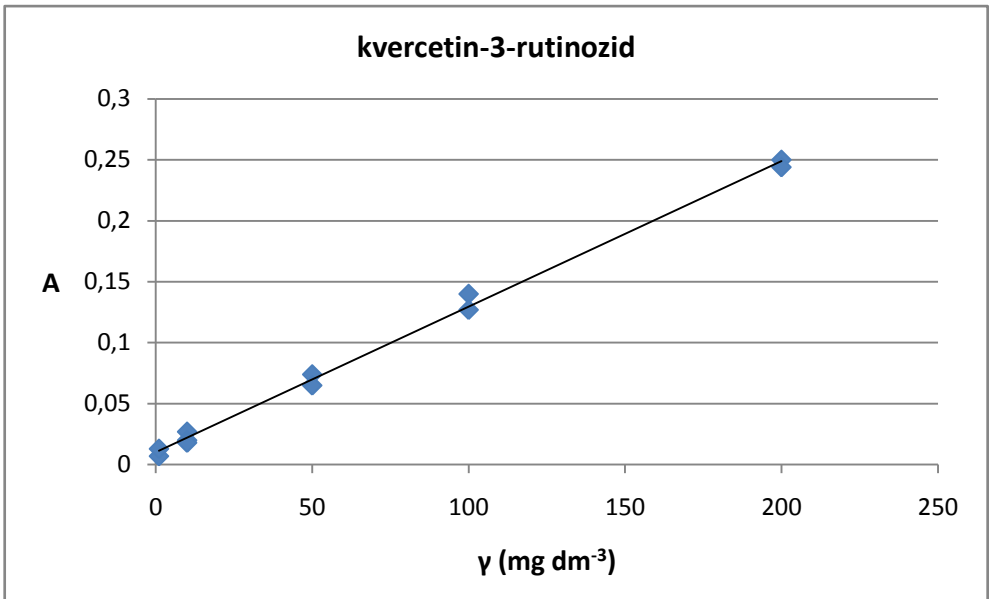


Slika 9 Kalibracijska krivulja kvercetin-3-rutinozida dobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih polifenola (Folin-Ciocalteau metoda). Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

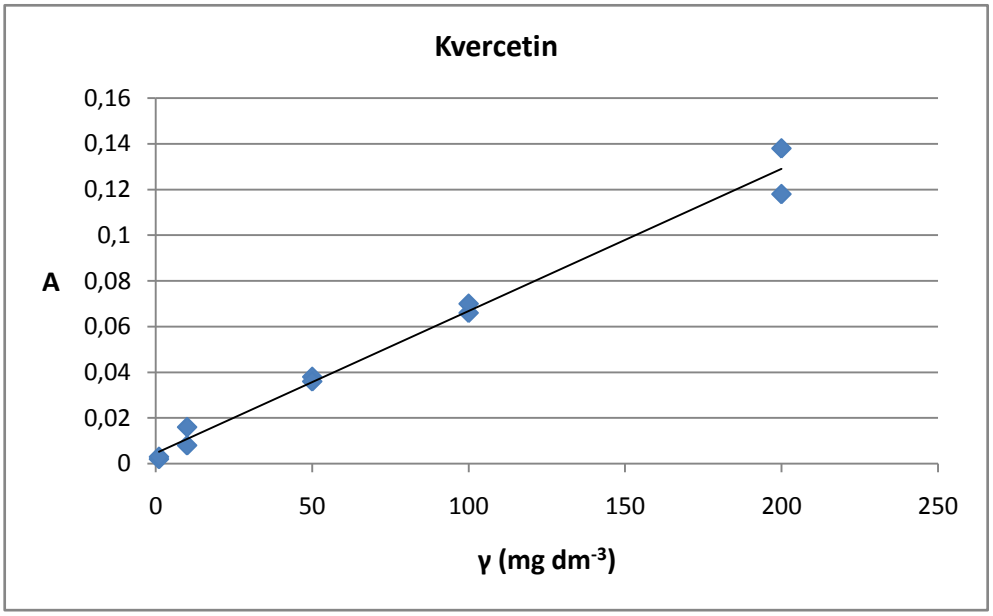
4.1.2.Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih flavonoida



Slika 10 Kalibracijska krivulja (+)-katehina dobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih flavonoida. Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

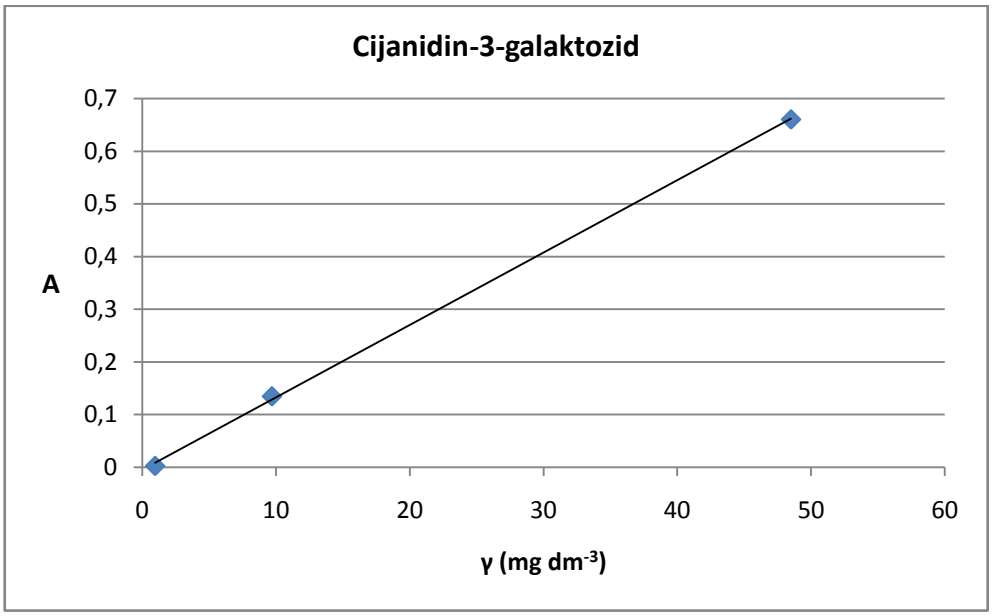


Slika 11 Kalibracijska krivulja kvercetin-3-rutinozida dobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih flavonoida. Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

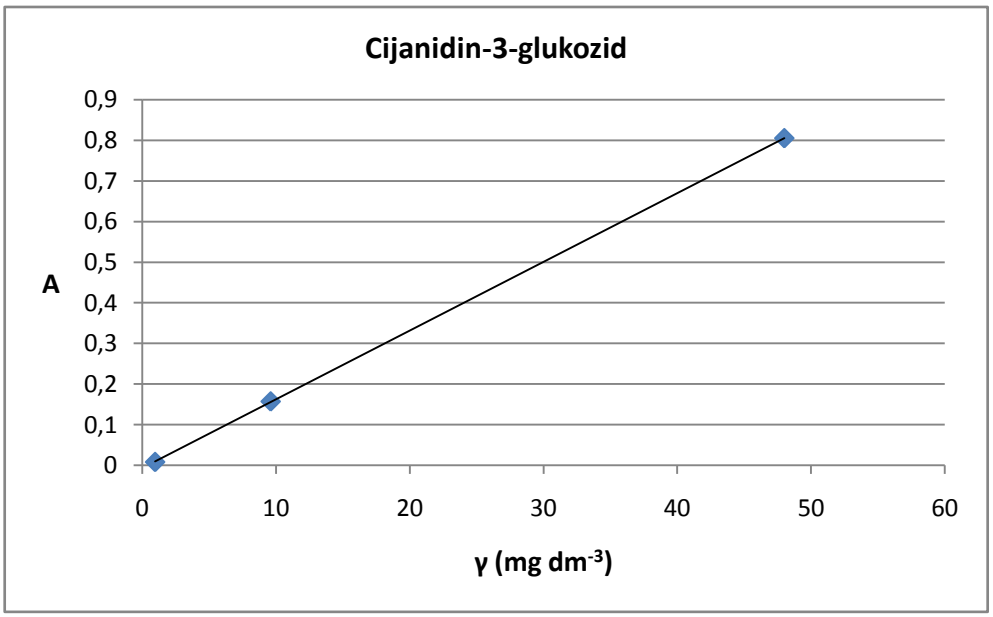


Slika 12 Kalibracijska krivulja kvercetinadobivena spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih flavonoida. Svaka koncentracija mjerena je dva puta (n=2)

4.1.3.Spektroskopska metoda za određivanje ukupnih antocijanina



Slika 13 Kalibracijska krivulja cijanidin-3-galaktozida dobivena spektroskopskom pH diferencijalnom metodom za određivanje ukupnih antocijanina. Svaka koncentracija mjerena je jednom (n=1)



Slika 14 Kalibracijska krivulja cijanidin-3-glukozida dobivena spektroskopskom pH diferencijalnom metodom za određivanje ukupnih antocijanina. Svaka koncentracija mjerena je jednom (n=1)

4.2. PARAMETRI VALIDACIJE SPEKTROSKOPSKIH METODA

Tablica 2 Linearnost*, granica detekcije (LOD)[a] i granica kvantifikacije (LOQ)[a]spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina

	Jednadžba pravca	r^2	LOD (mg dm^{-3})	LOQ (mg dm^{-3})
Ukupni polifenoli				
galna kiselina	y=0,0012x-0,0008	0,9967	1,36	4,13
(+)-katehin	y=0,0011x+0,012	0,9997	2,33	7,07
kvercetin-3-rutinozid	y=0,0008x+0,0035	0,9978	4,67	14,14
Ukupni flavonoidi				
(+)-katehin	y=0,0022x-0,0003	0,9982	0,64	1,93
kvercetin-3-rutinozid	y=0,0012x+0,0101	0,9969	0,78	2,36
kvercetin	y=0,0006x+0,0046	0,9871	1,44	4,35
Ukupni antocijanini				
Cijanidin-3-galaktozid	y=0,0137x-0,0049	0,9997	1,31	3,98
Cijanidin-3-glukozid	y=0,0169x-0,007	1	1,06	3,22

*linearnost izražena preko koeficijenta determinacije r^2

[a]LOD i LOQ dobivene pomoću odsječka i nagiba kalibracijske krivulje

Tablica 3 Preciznost*spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina

	Koncentracija (mg dm^{-3})	Koeficijent varijacije (%)
Ukupni polifenoli		
Vino (EG)[a]	1368,54 ± 76,02	5,55
(EK)[b]	1616,64 ± 85,89	5,56
(EKV3R)[c]	2220,00 ± 123,55	5,57
Ukupni flavonoidi		
Vino (EK)[b]	1153,08 ± 38,44	3,33
(EKV3R)[c]	1936,31 ± 67,28	3,47
(EKV)[d]	3973,44 ± 134,56	3,37
Ukupni antocijanini		
VinopH diferencijalna[e]	47,93 ± 6,37	13,29
(EC3GAL)[f]	54,16 ± 6,96	12,85
(EC3GLU)[e]	44,53 ± 5,64	12,67

*preciznost dobivena mjerenjem uzorka vina metodama za određivanje ukupnih polifenola i ukupnih flavonoida 6 puta (n=6) te metodom za ukupne antocijanine 4 puta (n=4)

[a] ekvivalenti galne kiseline

[b] ekvivalenti (+)-katehina

[c] ekvivalenti kvercetin-3-rutinozida

[d] ekvivalenti kvercetina

[e] ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

[f] ekvivalenti cijanidin-3-galaktozida

Tablica 4 Točnost*spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina

	Dodano standarda (mg dm^{-3})	Pronađeno standarda (mg dm^{-3})	Iskorištenje (%)
Ukupni polifenoli			
galna kiselina	100	102,22	102,22
(+)-katehin	100	101,41	101,41
kvercetin-3-rutinozid	100	106,22	106,22
Ukupni flavonoidi			
(+)-katehin	100	99,76	99,76
kvercetin-3-rutinozid	100	100,50	100,50
Kvercetin	100	99,17	99,17
Ukupni antocijanini			
pH diferencijalna[a]	48,00	40,59-49,60	83,70-103,30
cijanidin-3-galaktozid[b]	48,50	44,36	91,47
cijanidin-3-glukozid[c]	48,00	44,46	92,63

* nakon dodavanja standarda u vino, uzorci mjereni 2 puta (n=2)

[a]u vino dodano 48 mg dm^{-3} standarda cijanidin-3-glukozida i cijanidin-3-galaktozida, za računanje količine korišten molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida e 26900 l mol^{-1} cm^{-1}

[b] u vino dodano 48,50 mg dm^{-3} standarda cijanidin-3-galaktozida, za računanje upotrijebljena kalibracijska krivulja cijanidin-3-galaktozida

[c]u vino dodano 48 mg dm^{-3} standarda cijanidin-3-glukozida, za računanje upotrijebljena kalibracijska krivulja cijanidin-3-glukozida

Tablica 5 Osjetljivost*spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina

	Nagib kalibracijske krivulje
Ukupni polifenoli	
galna kiselina	0,0012
(+)-katehin	0,0011
kvercetin-3-rutinozid	0,0008
Ukupni flavonoidi	
(+)-katehin	0,0022
kvercetin-3-rutinozid	0,0012
kvercetin	0,0006
Ukupni antocijanini	
cijanidin-3-galaktozid	0,0137
cijanidin-3-glukozid	0,0169

*osjetljivost izražena preko nagiba kalibracijske krivulje

4.3. PARAMETRI VALIDACIJE KROMATOGRAFSKE METODE

Tablica 6 Parametri validacije kromatografske metode

Standard	Jednadžba*	r^{2*}	LOD* (mg dm^{-3})	LOQ* (mg dm^{-3})	Preciznost[a] KV (%)	Točnost[b] Iskorištenje (%)
galna kiselina	y=40950x+51385	0,9988	2,04	6,80	1,90-9,20	90,71
(+)-katehin	y=49351x-51897	0,9997	0,08	0,26	0,10-6,30	106,43
kvercetin-3-rutinozid	y=151290x-380700	0,9957	0,14	0,47	0,40-11,60	93,20
kvercetin	y=446180x-877340	0,9959	0,10	0,33	7,70-12,00	98,91
cijanidin-3-galaktozid	y=281610x-342840	0,9991	0,13	0,42	4,60-12,00	107,88
cijanidin-3-glukozid	y=322540x-382690	0,9995	0,80	2,70	0-12,90	98,46

*vrijednosti dobivene analizom standarda različitih koncentracija, svaka koncentracija injektirana jednom

[a] vrijednosti dobivene analizom ekstrakta kore jabuka crvenka i božićnica, ekstrakti pripremljeni u dvije paralele i svaki ekstrakt analiziran je jednom na HPLC uređaju (n=2) i četiri vrste vina u dvije paralele i svaka vrsta vina analizirana je jednom na HPLC uređaju (n=2)

[b] vrijednosti dobivene dodavanjem standarda u ekstrakt jabuke božićnica i u vino

5. RASPRAVA

Spektroskopske metode se često koriste za određivanje količine polifenolnih spojeva. One nisu specifične i koriste se za određivanje pojedinih skupina polifenola (flavonoidi, antocijanini) ili za određivanje ukupnih polifenola (Lin i Tang, 2007; Pontis i sur., 2014; Shaghaghi i sur., 2008). Greška koja se može javiti korištenjem ovih metoda je upotreba različitih standarda polifenola za izradu kalibracijske krivulje te upotreba tih krivulja za određivanje količine polifenola (Escarpa i sur., 201). Naime, u realnim uzorcima nalaze se različiti polifenoli te je potrebno znati koji polifenol je dominantan te koristiti kalibracijsku krivulju dominantnog polifenola. Niti ovaj način ne daje točne količine polifenola, ali se na ovaj način spektroskopske metode mogu koristiti za usporedbu količine polifenola u sličnim uzorcima. Nadalje, spektroskopske metode mogu se koristiti za praćenje koncentracije pojedinih polifenola u model otopinama (Simon i sur., 2015). U tu svrhu potrebno je validirati spektroskopske metode prema različitim polifenolnim standardima. Time se dobiva mogućnost praćenja količine polifenola u model otopinama jednostavnim, brzim i jeftinim spektroskopskim metodama. Cilj ovog rada bio je validirati tri spektroskopske metode koje se uobičajeno koriste za određivanje polifenola u različitim uzorcima prema najuobičajenijim polifenolima kao što su galna kiselina, kvercetin, kvercetin-3-rutinozid, (+)-katehin, derivati cijanidina. Ovi polifenoli uobičajeno se prate i u različitim model otopinama u različitim eksperimentalnim mjerenjima.

Kalibracijske krivulje galne kiseline, (+)-katehina i kvercetin-3-rutinozida dobivene spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih polifenola prikazane su na **Slikama 7**,**8** i **9**, a jednadžbe pravca i koeficijent determinacije u **Tablici 2**. Kalibracijski pravci su linearni (galna kiselina i (+)-katehin u koncentracijskom području od 1 do 1000 mg dm^{-3}, kvercetin-3-rutiozid 1 do 200 mg dm^{-3}) što pokazuju i koeficijenti determinacije (r^2 =0.9967 – 0.9997).

Spektroskopskom metodom za određivanje ukupnih flavonoida dobivene su kalibracijske krivulje za standarde (+)-katehin, kvercetin-3-rutinozid te kvercetin (**Slike 10**, **11** i **12**). Vidljivo je da je kalibracijska krivulja (+)-katehina linearna u području od 1 do 500 mg dm^{-3}, dok su kalibracijske krivulje za kvercetin-3-rutinozid i kvercetin linearne u području od 1 do 200 mg dm^{-3}. Koeficijent determinacije (r^2 =0,9969-0,9982) ukazuje na dobru linearnost (**Tablica 2**).

Metoda za ukupne antocijanine najčešće se koristi za određivanje količine antocijanina upotrebom formule koja uzima u obzir molarni ekstinkcijski koeficijent cijanidin—3-

glukozida. U tom slučaju ne upotrebljava se kalibracijska krivulja. U ovom radu cilj je bio pripremiti kalibracijske krivulje različitih antocijanina, validirati metodu te usporediti korištenje kalibracijskih krivulja u određivanju količine antocijanina s upotrebom uobičajene formule. Dobivene su kalibracijske krivulje za cijanidin-3-galaktozid i cijanidin-3-glukozid (**Slika13** i **14**). Vidljivo je da su kalibracijske krivulje cijanidin-3-galaktozida i cijanidin-3-glukozida linearne u području od 1 do 50 mg dm^{-3}, r^2 = 0.9997 – 1 (**Tablica 2**).

Granice detekcije i granice kvantifikacije spektroskopskih metoda prikazane su u **Tablici 2**. Spektroskopske metode dale su prihvatljivo niske granice detekcije (ukupni polifenoli 1,4 do 4,7,ukupni flavonoidi 0,6 do 1,4, ukupni antocijanini oko 1 mgdm^{-3}) i kvantifikacije (ukupni polifenoli 4 do 14, ukupni flavonoidi 1,9 do 4,3, ukupni antocijanini 3,2 do 4 mg dm^{-3}).

Preko koeficijenta varijacije pokazala se dobra (5,6 % (ukupni polifenoli), 3,4 do 3,5 (ukupni flavonoidi)) ili prihvatljiva (ukupni antocijanini 12,7 do 12,9 %) preciznost spektroskopskih metoda (**Tablica 3**). Osim toga, u **Tablici 3** su prikazane količine ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina u vinu određenih prema različitim kalibracijskim krivuljama. Može se vidjeti da se dobiju različite količine polifenola ukoliko se za izražavanje rezultata koriste različiti spojevi. Galna kiselina u metodi za ukupne polifenole dala je najniže (1368 mg dm^{-3}), a kvercetin-3-rutinozid najveće rezultate (2220 mg dm^{-3}). Ukoliko se ukupni flavonoidi izražavaju prema (+)-katehinu dobiju se najniži rezultati (1153 mg dm^{-3}), dok kvercetin daje najveće rezultate (3972 mg dm^{-3}). Ukupni antocijanini određeni prema kalibracijskoj krivulji cijanidin-3-glukozida (44,5 mg dm^{-3})i prema formuli koja se inače upotrebljava u ovoj metodi, a koja već upotrebljava molarni ekstinkcijski koeficijent cijanidin-3-glukozida (47,9 mg dm^{-3}), vrlo su slični. Može se zaključiti da je upotreba formule ili kalibracijske krivulje dobra za određivanje ukupnih antocijanina. Rezultati prema cijanidin-3-galaktozidu su slični (54 mg dm^{-3}).

Točnost spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina dobivena je dodavanjem standarda u vino, a rezultati su prikazani u **Tablici 4**. Najmanje iskorištenje dobiveno je kod metode za ukupne antocijanine za standarde cijanidin-3-galaktozid (91,47 %), te za cijanidin-3-glukozid (92,63 %).Također iz **Tablice 4**je vidljivo da je najveće iskorištenje dobiveno pri izvođenju metode za ukupne polifenole kod galne kiseline (102,22 %), te kvercetin-3-rutinozida (106,22 %).Točnost svih metoda je prihvatljiva.

Osjetljivost spektroskopskih metoda za određivanje ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i ukupnih antocijanina, izražena preko nagiba kalibracijskih krivulja, prikazana je u **Tablici 5** gdje je vidljivo da je dobivena najosjetljivija kalibracijska krivulja za ukupne polifenole prema galnoj kiselini (0,0012), dok je metoda za ukupne flavonoide najosjetljivija prema (+)-katehinu (0,0022). Prema tome, standardi koji se inače koriste za kalibraciju pokazali su najveću osjetljivost. Metoda za ukupne antocijanine pokazuje veću osjetljivost ukoliko se kao standard koristi cijanidin-3-glukozid (0,0169), dok kalibracijska krivulja cijanidin-3-galaktozida pokazuje manju osjetljivost (0,0137). I kod ove metode pokazalo se da je antocijanin koji se inače koristi za kalibraciju daje metodi veću osjetljivost.

Tablica 6 prikazuje parametre validacije kromatografske metode: koeficijent determinacije r^2, granicu detekcije (LOD) u mg dm^{-3}, granicu kvantifikacije (LOQ) u mg dm^{-3} dobivenu analizom standarda različitih koncentracija, zatim preciznost izraženu preko koeficijenta varijacije u %, te točnost izraženu kao iskorištenje u %. Prema dobivenim koeficijentima determinacije vidljivo je da su kalibracijske krivulje linearne (r^2 od 0,9957 do 0,9997) s prihvatljivim limitima detekcije (od 0,08 do 2,04 mg dm^{-3}) i kvantifikacije (0,26 do 6,80 mg dm^{-3}). Preciznost (koeficijent varijacije do 12,9 %) i točnost metode (od 90,71 do 107,88 %) također se pokazala kao prihvatljiva. Najveću osjetljivost ima kalibracijska krivulja kvercetina, a najmanju galna kiselina.

Prema određenim parametrima validacije, ispitane spektroskopske metode mogu se preporučiti za određivanje polifenolnih skupina i ukupnih polifenola u različitim uzorcima. Standardi polifenola koji se uobičajeno koriste za dobivanje kalibracijskih krivulja (galna kiselina za ukupne polifenole, (+)-katehin za ukupne flavonoide, cijanidin-3-glukozid za ukupne antocijanine) pokazuju najveću osjetljivost, no kalibracijske krivulje i ostalih ispitanih polifenola, mogu se koristiti za dobivanje kvantitativnih podataka. Nadalje, ispitane metode mogu se preporučiti za mjerenje pojedinog polifenola u model otopinama u kojima se prati koncentracija tog polifenola, uz upotrebu istog polifenola za dobivanje kalibracijske krivulje. Primjer takvog modela je model adsorpcije polifenola na prehrambeno vlakno. Prehrambeno vlakno se uklanja iz otopine ultrafiltracijom, a koncentracija zaostalog polifenola može se pratiti spektroskopskim metodama.

Kromatografska metoda pokazala je da je točna i precizna u ispitivanom području koncentracija, što je bilo i očekivano.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Spektroskopske i kromatografske metode pokazale su se kao linearne metode za sve korištene standarde u promatranom rasponu koncentracija.
2. Dobivene granice detekcije i granice kvantifikacije za sve standarde bile su u prihvatljivim granicama validacije.
3. Spektroskopske i kromatografske metode pokazale su se kao točne i precizne metode.
4. Osjetljivost spektroskopskih metoda je različita za različite standarde, a najveću osjetljivost pokazali su standardi polifenola koji se uobičajeno koriste za dobivanje kalibracijske krivulje (galna kiselina za ukupne polifenole, (+)-katehin za ukupne flavonoide, cijanidin-3-glukozid za ukupne antocijanine). Kod kromatografske metode, najveću osjetljivost pokazao je kvercetin, a najmanju galna kiselina.
5. Validacijom ovih metoda pokazalo se da se one mogu koristiti za određivanje količine polifenolnih spojeva u realnim uzorcima i modelnim otopinama.

7. LITERATURA

AOAC International: AOAC Peer-verified methods program, Manual on policies and procedures, 1998.http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=C3D82F9AE00CA520AF2E3F46E67E8D6E?doi=10.1.1.196.7223&rep=rep1&type=pdf [15.09.2015.]

Araujo P: Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of Chromatography B 877: 2224-2234, 2009.

Box, JD: Investigation of the Folin-Ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. Water Research 17: 511-525, 1981.

Cuadros-Rodriguez L, Gamiz-Gracia L, Almansa-Lopez EM, Bosque-Sendra JM: Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. Trends in Analytical Chemistry 20: 620-636, 2001.

Currie, LA., Svehla, G.: Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC recomendations 1994). Pure and Applied Chemistry 66: 595-608, 1994.

Escarpa A, Gonzalez MC: Approach to the contents of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. Analytica Chimica Acta 427: 119-127, 2001.

Gonzalez AG, Herrador MA: A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. Trends in Analytical Chemistry 26:227-238, 2007.

Huber L: Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Informa Healthcare, USA, 2007.

Jakobek L, Barron, AR: Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds. Journal of Food Composition and Analysis 45: 9-15, 2016.

Lazarić, K: *Validacija analitičkih metoda –teorija. Što je to validacija?*Svijet po mjeri, Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, 2002.

Lin JY, Tang CY: Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Fod Chemistry 101: 140-147, 2006.

Magnusson B, Örnemark U: Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second Edition, 2014. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf[20.09.2015.]

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. The Americal Journal of Clinical Nutrition 79: 727-747, 2004.

Mengcheng T, Zhishen J, Jianming W: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 64: 555-559, 1999.

Pontis JA, Costa LAMA, Silva SJR, Flach A: Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. Food Science and Technology 34: 69-73, 2014.

Shaghaghi M, Manzoori JL, Jouyban A: Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. Food Chemistry 108: 695–701, 2008.

Simon V, Thuret A, Candy L, Bassil S, Duthen S, Raynaud C, Masserom A: Recovery of hydroxycinnamic acids from renewable resources by adsorption on zeolites. Chemical Engineering Journal 280: 748-754, 2015.

Singleton LV, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM: Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in enzymology 299: 152-178, 1999.

Taverniers I, Van Bockstaele E , De Loose M: Trends in quality in the analytical laboratory. I.Traceability and measurement uncertainty of analytical results. Trends in Analytical Chemistry 23: 480-490, 2004.

Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E: Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. Trends in Analytical Chemistry 23:535-552, 2004.

Thompson M, Ellison SLR, Wood R: Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report). Pure and Applied Chemistry 74:835-855, 2002.

Tonutare T, Moor U, Szajdak L: Strawberry anthocyanin determination by pH differential spectroscopic method-How to get true results? ACTA Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus 13:35-47, 2014.

Van der Voet H, Van Rhijn JA, Van de Wiel HJ: Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. Analytica Chimica Acta 391:159-171, 1999.

Van Zoonen P, Hoogerbrugge R, Gort SM, Van de Wiel HJ, Van't Klooster HA: Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. Trends in Analytical Chemistry 18:584-593, 1999.

Zwanziger, HW, Sârbu, C: Validation of Analytical methods using a regression procedure. Analytical Chemistry 70: 1277-1280, 1998.