

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Jelena Kralj

7107/PT

**PRIMJENA 2D-KORELACIJSKE UV/VIS SPEKTROSKOPIJE ZA
DETEKCIJU UMJETNIH BOJILA U VOĆNIM SOKOVIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: izv.prof.dr.sc. Damir Iveković

Zagreb, 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehnološke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Primjena 2D-korelacijske UV/VIS spektroskopije za detekciju umjetnih bojila u voćnim sokovima

Jelena Kralj, 00161037267

Sažetak:

U radu je istražena primjena 2D-korelacijske spektroskopije za detekciju umjetnih bojila u voćnim sokovima crnog ribiza. Spektrofotometrijski su snimani uzorci soka, bojila i soka sa dodatkom bojila u području pH vrijednosti od 3,5 do 5,0 s rezolucijom od 1 nm u području valnih duljina od 400 do 700 nm. Dobiveni spektri su filtrirani Savitzky-Golayevom metodom, derivirani i korišteni za izradu sinkronih i asinkronih korelacijskih mapa. Usporedbom dobivenih korelacijskih mapa u području valnih duljina većih od 530 nm mogu se jasno detektirati spektralne promjene uzrokovane dodatkom umjetnog bojila u sok.

Ključne riječi: 2D-korelacijska spektroskopija, umjetna bojila, voćni sok

Rad sadrži: 26 stranica, 14 slika, 1 tablica, 18 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Damir Iveković

Pomoć pri izradi: dr.sc. Marina Palčić

Datum obrane: 16. srpanj 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University Undergraduate study Food Technology

Department of chemistry and biochemistry

Laboratory for basic chemistry, analytical chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnological sciences

Scientific field: Food Technology

Application of 2D-correlation UV/VIS spectroscopy for detection of color additives in fruit juices

Jelena Kralj, 00161037267

Abstract:

This work explores the application of 2D-correlation spectroscopy for the detection of color additives in fruit juices of black currant. The samples of juice, azo-dyes and juice with azo-dyes were spectroscopically examined in the pH range from 3.5 to 5.0, with a resolution of 1 nm in the wavelength range from 400 to 700 nm. Collected spectra were smoothed by the Savitzky-Golay method, numerically derived and employed for calculation of synchronous and asynchronous correlation maps. Spectral changes caused by the addition of azo-dyes to the juice can be clearly detected by comparing the obtained correlation maps in the wavelength range greater than 530 nm.

Keywords: 2D-correlation spectroscopy, color additives, fruit juice

Thesis contains: 26 pages, 14 figures, 1 table, 18 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Damir Iveković, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance: Marina Palčić, PhD, postdoctoral researcher

Defence date: 16. July 2018

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI UVOD	2
2.1. Dvodimenzijska (2D) korelacijska spektroskopija	2
2.1.1. Temeljna načela 2D korelacijske spektroskopije	2
2.1.2. Analiza 2D korelacijskih spektara	6
2.2. Sintetska bojila	6
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Materijali	9
3.1.1. Kemikalije	9
3.1.2. Uzorci	9
3.1.3. Instrumentacija	9
3.2. Metode	9
3.2.1. Priprema uzorka za analizu	9
3.2.2. Provedba analize	11
3.2.3. Obrada podataka	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. Preliminarna ispitivanja	12
4.2. Spektroskopsko ponašanje bojila	15
4.3. Spektroskopske promjene u uzorcima soka s dodanim bojilima	18
4.4. 2D korelacijski spektri uzoraka	20
5. ZAKLJUČAK	24
6. POPIS LITERATURE	25

1. UVOD

Bojila se u prehrambene proizvode uobičajeno dodaju radi korekcije boje zbog narušenog vanjskog izgleda, ali i postizanja vizualne privlačnosti konačnog proizvoda. U Republici Hrvatskoj prema važećem Pravilniku o prehrambenim aditivima zabranjeno je dodavanje bojila voćnim sokovima i nektarima te soku od povrća (NN 62/2010). Uobičajeno se za detekciju bojila u hrani koriste tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, najčešće uz UV-VIS spektroskopsku detekciju pomoću matričnog diodnog detektora (HPLC-DAD) i diferencijalna pulsna voltometrija (Combeau i sur., 2002; Miniotti i sur., 2007). Nedostatak obje metode je njihova relativno visoka cijena, dugotrajnost te potreba za educiranim analitičkim kadrom.

Kao alternativne metode analize složenih uzoraka kao što je hrana u posljednje se vrijeme intenzivno istražuju brze, jeftine i jednostavne spektroskopske metode. Iako te metode najčešće nisu dovoljno selektivne za određivanje ciljane komponente uzorka, njihova se selektivnost može značajno povećati primjenom kemometrijskih metoda, čime se nedostatak kemijske selektivnosti nadomješta matematičkom selektivnošću. Jedna od atraktivnih metoda za analizu složenih uzoraka je dvodimenzijaska (2D) korelacijska spektroskopija. Metoda omogućuje da se složeni spektri kompleksnog uzorka, koji sadrže preklopljene spektralne signale mnoštva komponenata, pojednostave uz istovremeno poboljšanje spektralne rezolucije, postignuto širenjem spektra u dvije dimenzije.

U ovom radu istražena je primjena 2D-korelacijske UV/VIS spektroskopije za detekciju umjetnih bojila u voćnim sokovima, s ciljem razvoja brze i jednostavne metode za utvrđivanje patvorenja voćnog soka dodatkom umjetnog bojila.

2. TEORIJSKI UVOD

2.1. Dvodimenzijska (2D) korelacijska spektroskopija

Dvodimenzijska (2D) korelacijska spektroskopija relativno je nova analitička tehnika, razvijana unazad 25 godina. Ona omogućava odabir korisnih informacija iz spektara dobivenih snimanjem uzorka pod utjecajem vanjskih pobuda ovisnih o vremenu, poput kemijskih reakcija i procesa fizikalne relaksacije, ali i statičkih učinaka, poput temperature ili promjene koncentracije sastojaka. Sustavne varijacije u spektralnim intenzitetima uzrokovane pobudom koriste se za konstrukciju 2D-korelacijskog spektra (sinkronog i asinkronog) primjenom jedne od inačica unakrsne korelacijske analize. 2D-korelacijska analiza može se primijeniti na velikom broju spektroskopskih i njima srodnih analitičkih metoda, poput infracrvene i ramanske spektroskopije, fluorescencije, nuklearne magnetske rezonancije ili rendgenske difrakcijske analize (Noda, 1993 ; Noda i sur., 2000; Noda i Ozaki, 2004). Osim u spektroskopiji, koncept sličan 2D-korelacijskoj analizi primjenjuje se i u kromatografiji i mikroskopiji (Noda i Ozaki, 2004).

Osnovne prednosti 2D-korelacijske spektroskopije su pojednostavljenje složenih spektara koji se sastoje od mnoštva preklapljenih maksimuma te poboljšanje rezolucije spektra širenjem maksimuma kroz dvije dimenzije. Zbog tih se prednosti 2D-korelacijska spektroskopija često koristi za proučavanje kompleksnih, višekomponentnih uzorka, kod kojih se na temelju varijacija spektralnih intenziteta u asinkronom spektru, uzrokovanih vanjskom pobudom, može odrediti slijed spektralnih promjena (Noda, 2015).

Metoda 2D korelacije koristi se kao pomoć u istraživanjima višekomponentnih sustava kao što su hrana, voda i poljoprivredni proizvodi, gdje omogućuje praćenje promjena tijekom obrade hrane, miješanja i fermentacije (You, 2015).

2.1.1. Temeljna načela 2D-korelacijske spektroskopije

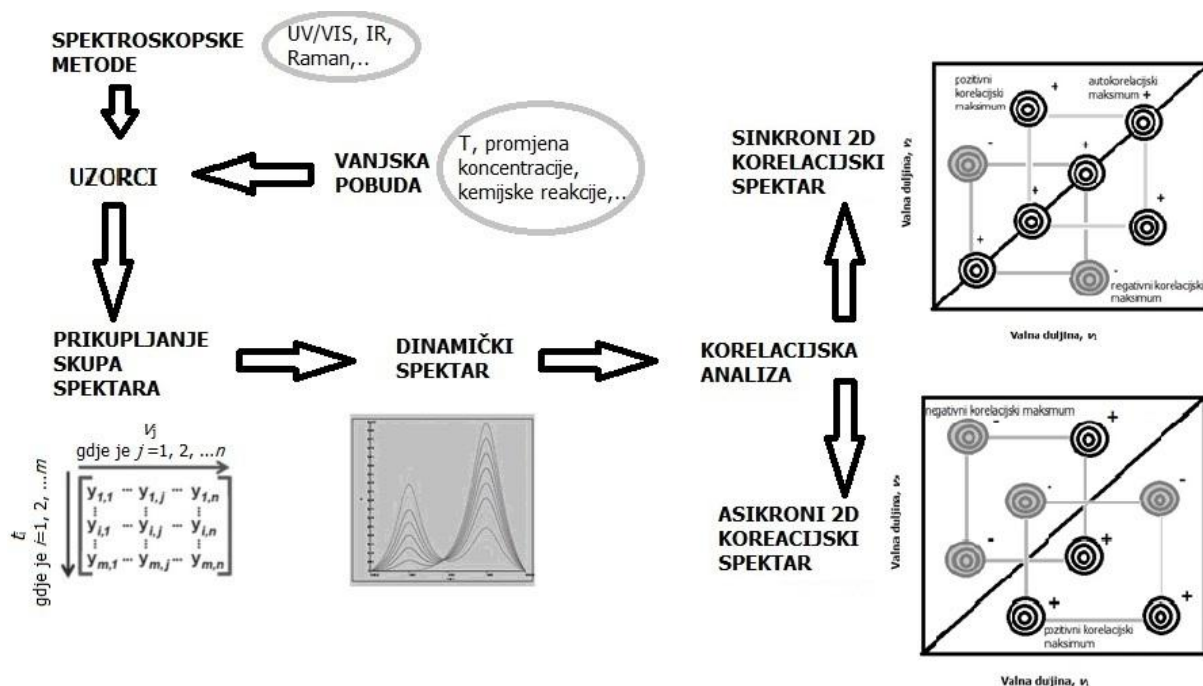
Prema općoj shemi 2D korelacije (slika 1) prvo se prikuplja skup spektara $A(\nu_j, t_i)$, sačinjen od m spektara dobivenih kao funkcija spektralne varijable ν_j (gdje je $j = 1, 2, \dots, n$) i varijable pobude t_i (gdje je $i = 1, 2, \dots, m$) tijekom definiranog intervala između t_{i1} i t_{in} . Spektralna varijabla ν ovisi o upotrebnoj analitičkoj metodi, primjerice predstavlja valnu duljinu pobudnog elektromagnetskog zračenja. Varijabla pobude t predstavlja jednu od brojnih vanjskih pobuda kao što su vrijeme, temperatura, promjena koncentracije i ostale.

Da bi se skup spektralnih podataka dobiven pod utjecajem pobuda unutar intervala t_i t_m mogao transformirati u 2D-korelacijski spektar korištenjem unakrsne korelacije, potrebno je prevesti ga u dinamički spektar, $\tilde{A}(v_j, t_i)$, definiran sa:

$$\tilde{A}(v_j, t_i) = A(v_j, t_i) - \bar{A}(v_j)$$

gdje je $\bar{A}(v_j)$ referentni spektar sustava, koji se u većini slučajeva dobiva kao prosječni spektar:

$$\bar{A}(v_j) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m A(v_j, t_i)$$



Slika 1. Opća shema izračunavanja 2D korelacijskih spektara

Sinkroni 2D-korelacijski spektri

Sinkroni korelacijski spektar $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ predstavlja korelaciju istodobnih varijacija spektralnih intenziteta snimljenih pri dvije različite valne duljine, gdje su ν_1 i ν_2 dane formulom:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \tilde{A}(\nu_1, t_i) \times \tilde{A}(\nu_2, t_i)$$

Dobivena vrijednost je mjera sličnosti između spektralnih intenziteta uz vanjsku pobudu varijable t_i . Velika vrijednost $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ označava da se spektralni intenzitet od ν_1 do ν_2 mijenja koordinirano, sugerirajući zajedničko ili povezano porijeklo spektralnih intenziteta. Dana jednadžba prikazuje da je sinkroni korelacijski spektar zapravo kovarijanca spektralnih intenziteta pri valnim duljinama ν_1 i ν_2 .

Dvodimenzijski korelacijski spektri često se prikazuju kao konturne mape korelacijskih spektara u spektralnoj ravnini, omeđenoj osima s dvije nezavisne valne duljine. Sinkroni spektar ima oblik simetrične mape, tj. vrijednosti $\Phi(\nu_a, \nu_b)$ i $\Phi(\nu_b, \nu_a)$ su jednake u odnosu na glavnu dijagonalu mape, na kojoj se nalaze točke $\Phi(\nu, \nu)$. Maksimumi na glavnoj dijagonali su uvijek pozitivni i nazivaju se *autokorelacijskim maksimumima*, zato što intenzitet sinkronog spektra na dijagonali odgovara autokorelaciji funkcije varijacije spektralnih intenziteta. Intenzitet autokorelacijskog maksimuma proporcionalan je ukupnoj dinamičkoj promjeni spektralnog signala pri određenoj valnoj duljini, uzrokovanoj vanjskom pobudom. Drugim riječima, ako u nekom području spektra tijekom vanjske pobude uzorka dolazi do spektralne promjene, u tom će se području pojaviti i autokorelacijski maksimum, a njegov će intenzitet biti to veći, što je spektralna promjena pri toj valnoj duljini izraženija.

Korelacijski maksimumi koji se nalaze izvan dijagonale sinkronog 2D-korelacijskog spektra odgovaraju kovarijanci spektralnih intenziteta izmjerenih tijekom vanjske pobude uzorka na dvije različite valne duljine. Ti korelacijski maksimumi mogu biti pozitivni i negativni. Negativni korelacijski maksimumi ukazuju da su spektralne promjene na promatrane dvije valne duljine obrnutog smjera (dok intenzitet spektra na jednoj valnoj duljini raste, na drugoj se smanjuje). Ako je korelacijski maksimum pozitivan, intenziteti spektara na obje valne duljine mijenjaju se u istom smjeru (oba intenziteta rastu, ili se oba smanjuju). Kako bi se negativni korelacijski maksimumi jasno razlikovali od pozitivnih,

uobičajilo se da se negativni maksimumi u dvodimenzijским korelacijskim mapama označavaju sjenčanjem ili isprekidanim konturnim linijama.

Asinkroni 2D-korelacijski spektri

Asinkroni 2D-korelacijski spektrar $\psi(v_1, v_2)$ predstavlja korelaciju sekvencijalnih varijacija spektralnog intenziteta izmjerenih pri v_1 i v_2 . Asinkroni korelacijski spektra računa se pomoću relacije (Noda, 2015):

$$\psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m \tilde{A}(v_1, t_i) \times \sum_{k=1}^m N_{ij} \tilde{A}(v_2, t_k)$$

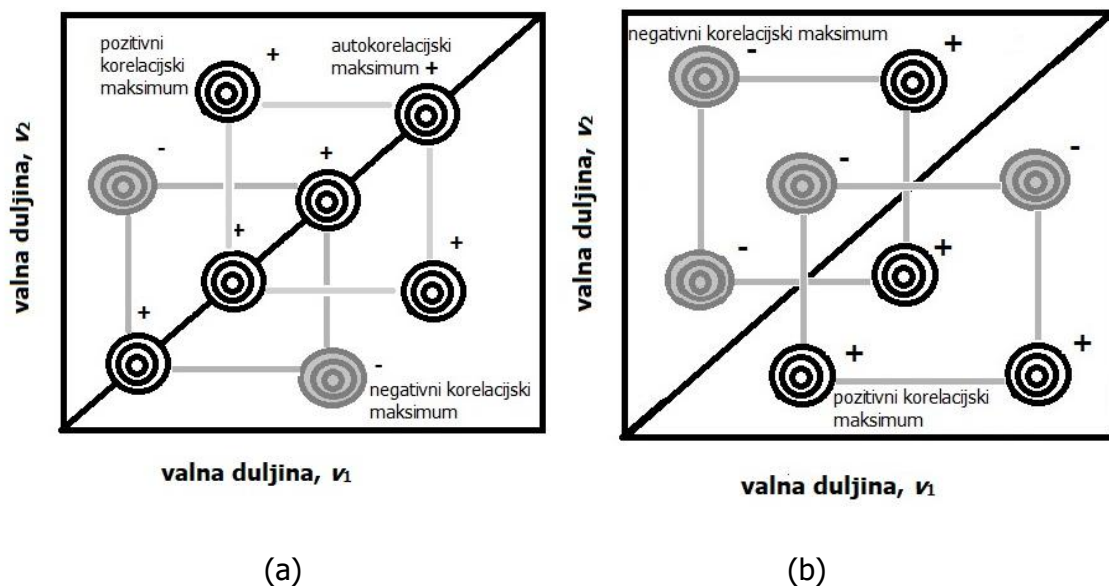
gdje je N_{ij} tzv. Hilbert-Nodina transformacijska matrica, dana sa:

$$N_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{kada je } i = j \\ 1 & \\ \pi(j-i) & \text{u ostalim slučajevima} \end{cases}$$

gdje j označava stupce matrice, a i redove matrice. Intenzitet asinkronog korelacijskog spektra signifikantno je različit od nule samo ako između promjena spektralnih intenziteta izmjerenih pri dvije različite valne duljine postoji vremenski pomak, tj. ako promjena pri jednoj valnoj duljini prethodi promjeni pri drugoj valnoj duljini, ili kasni za njom. Drugim riječima, vrijednost $\psi(v_1, v_2)$ signifikantno različita od nule upućuje na zaključak da spektralne promjene opažene pri v_1 i v_2 ne odgovaraju istom procesu, već su povezane s različitim procesima. Asinkrona 2D-korelacijska spektralna mapa sastoji se od korelacijskih maksimuma smještenih isključivo izvan dijagonale. Mapa je antisimetrična jer vrijedi relacija $\psi(v_a, v_b) = -\psi(v_b, v_a)$, tj. za svaki pozitivni maksimum postoji odgovarajući negativni maksimum smješten simetrično s obzirom na dijagonalu $v_1 = v_2$.

2.1.2. Analiza 2D-korelacijskih spektara

Razrađen je niz pravila koja omogućuju određivanje redoslijeda varijacija spektralnih intenziteta na temelju usporedbe predznaka korelacijskih maksimuma u sinkronim i asinkronim 2D-korelacijskim spektrima (slika 2). Ako su predznaci sinkronih i asinkronih korelacijskih maksimuma smještenih na istoj spektralnoj koordinati (ν_1 , ν_2) jednaki, tada tijekom vanjske pobude uzorka spektralna promjena pri ν_1 prethodi spektralnoj promjeni pri ν_2 . Obratno, ako su predznaci sinkronih i asinkronih korelacijskih maksimuma smještenih na istoj spektralnoj koordinati (ν_1 , ν_2) različiti, tada spektralna promjena pri ν_1 kasni za spektralnom promjenom pri ν_2 . Ako se na spektralnoj koordinati (ν_1 , ν_2) pojavljuje sinkroni korelacijski maksimum, a na toj se koordinati ne opaža nikakav asinkroni korelacijski maksimum, tada se spektralne promjene na ν_1 i ν_2 događaju istovremeno. U rijetkim slučajevima (uglavnom kod izuzetno slabo izraženih spektralnih promjena), kada se pri nekoj spektralnoj koordinati (ν_1 , ν_2) u asinkronom korelacijskom spektru pojavljuje korelacijski maksimum, dok se u sinkronom spektru pri toj koordinati ne opaža nikakav maksimum, redoslijed promjena spektralnih intenziteta nije moguće ustanoviti (Noda, 2015).



Slika 2. Shematski prikaz sinchronog (a) i asinchronog (b) 2D-korelacijskog spektra

2.2. Sintetska bojila

Prema Pravilniku o prehranbenim aditivima, «prehranbeni aditiv» jest svaka tvar koja se sama po sebi ne konzumira kao hrana niti je prepoznatljiv sastojak određene hrane

bez obzira na hranjivu vrijednost, a čije je dodavanje hrani namjerno zbog tehnoloških razloga u proizvodnji, preradi, pripremi, obradi, pakiranju, prijevozu ili skladištenju i ima za posljedicu, ili se može očekivati da će imati za posljedicu, da će aditiv ili njegov derivat postati izravno ili neizravno sastojak hrane (NN 62/2010). «Bojila» su definirana kao tvari koje daju, pojačavaju ili obnavljaju boju u hrani, a obuhvaćaju osim sintetiziranih bojila i prirodne sastojke hrane i prirodne izvore koji se obično ne uzimaju kao hrana i koji se obično ne koriste kao tipični sastojci hrane (NN 62/2010). Aditivi iz kategorije bojila koriste se uglavnom zbog korekcije narušenog vizualnog izgleda tijekom prerade, skladištenja, pakiranja ili transporta, postizanja vizualne privlačnosti hrane i obojenja bezbojne hrane. Bojila se prema karakteru kromofornih skupina dijele na azo-, indigoidna, sumporna, antrakinonska i trifenilmetanska bojila. Za obojenost su odgovorne kromoforne funkcionalne skupine vezane na konjugirani sustav koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje određenih valnih duljina vidljivog spektra. Azo-bojila sadrže najmanje jednu azo-skupinu vezanu na aromatsku jezgru i auksokromne skupine (npr. -OH, -NH₂, -COOH) koje pojačavaju obojenost spojeva. Uobičajena podjela azo-bojila je prema broju azo-skupina u molekuli, a taj broj ujedno određuje boju. Crvena bojila sadrže jednu azo-skupinu i dolaze u obliku crvenih kristala lako topljivih u vodi zbog prisutnosti sulfo skupine, a slabo topljivih u etanolu. Bojila u hrani uglavnom podliježu oksidacijskim i redukcijskim reakcijama.

Za detekciju i određivanje bojila u hranitipično se primjenjuje tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, najčešće uz UV-Vis spektroskopsku detekciju pomoću matričnog diodnog detektora (HPLC-DAD), ili diferencijalna pulsna voltometrija (Combeau i sur., 2002; Miniotti i sur., 2007). Kada se koristi HPLC-DAD analiza uobičajeno se primjenjuje kromatografija obrnutih faza, tipično s C₁₈ stacionarnom fazom te mobilnom fazom koju sačinjava vodena otopina pufera (npr. amonijeva acetata) u smjesi s metanolom i/ili acetonitrilom. Tekuće uzorke je prije analize potrebno razrijediti, a čvrste uzorke homogenizirati i otopiti. Uzorci se stavljaju u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta kako bi došlo do potpune ekstrakcije bojila, nakon čega se filtriraju. Prije injektiranja filtrata u kolonu vrši se kalibracija instrumenta standardima bojila, najčešće u rasponu između 0,1 i 60 mg/L. Tipični limiti detekcije iznose 0,06 mg/L. Kromatografsko određivanje bojila vrši se pri pH-vrijednosti od otprilike 7 (Miniotti i sur., 2007). Za određivanje bojila diferencijalnom pulsnom voltametrijom koristi se stacionarna ili kapajuća živina elektroda. Bojila se otapaju u deioniziranoj vodi i kao takva koriste za analizu. Najpogodnijim elektrolitom za analizu bezalkoholnih pića smatra se fosfatni pufer čija je pH-vrijednost jednaka 9. Koncentracija boje se određuju metodom standardnog dodatka. Ova metoda omogućuje dobro razdvajanje strujnih maksimuma pri konstantnom pH (Combeau i sur., 2002).

Ako su sintetska bojila onečišćena intermedijarima ili nusproduktima procesa sinteze, kao što su sulfonirani derivati, nesulfonirane boje i njihovi klorirani derivati, mogu pokazivati kancerogena i toksična svojstva (Capitán-Vallvey i sur., 2002). Pripisuje im se i pseudo-alergijski učinak praćen oticanjem tkiva i svrbežom kada se koriste sa lijekovima poput acetilsalicilne kiseline (EFSA).

Prema članku 38. trenutno važećeg Pravilnika o prehranbenim aditivima (NN 62/2010), u Republici Hrvatskoj zabranjeno je dodavanje bojila voćnim sokovima i nektarima kako su definirani Pravilnikom o voćnim sokovima i njima srodnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN, 20/2009) te soku od povrća.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Prehrambena bojila korištena u ovom radu (Tablica 1) dobavljena su od Eurocerta. Otopine prehrambenih bojila, masene koncentracije $\rho(\text{bojilo}) = 0,100 \text{ g/dm}^3$, priređene su otapanjem bojila u deioniziranoj vodi.

Za povećavanje puferuskog kapaciteta analiziranih uzoraka korištena je otopina natrijeva formijata i natrijeva acetata u vodi, $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 0,25 \text{ mol/L}$ i $c(\text{HCOONa}) = 0,25 \text{ mol/L}$, čija je pH vrijednost pomoću koncentrirane otopine HCl podešana na 3,4. Za promjenu vrijednosti pH puferiranih uzoraka korištena je otopina NaOH, masene koncentracije $\rho(\text{NaOH}) = 200 \text{ g/dm}^3$.

3.1.2. Uzorci

Kao realni uzorci u ovom su radu korišteni nektari od crnog ribiza, s minimalnim udjelom voća od 25 %, proizvedeni od (djelomično) koncentriranog soka, sljedećih proizvođača: (1) Maraska, (2) Spar i (3) Fructal.

3.1.3. Instrumentacija

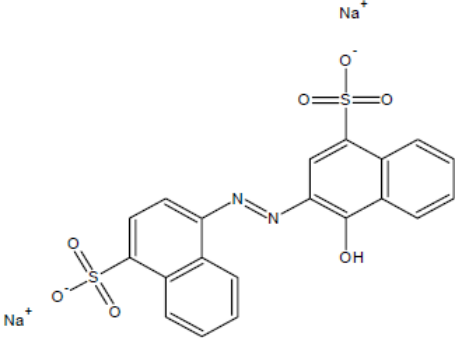
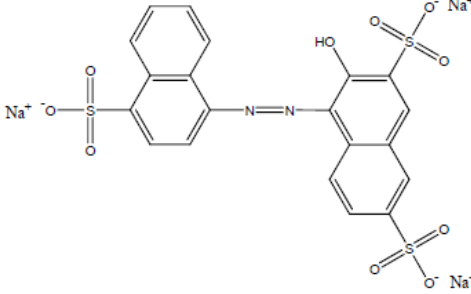
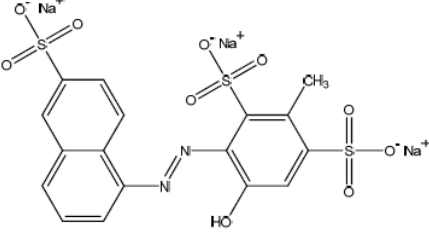
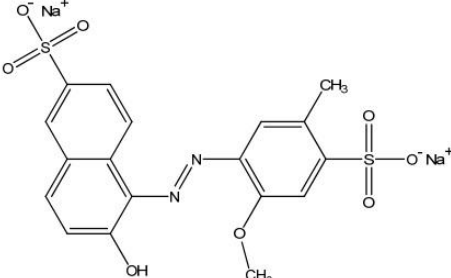
Za snimanje apsorpcijskih spektara uzoraka u vidljivom području spektra korišten je dvoznačni UV/VIS spektrofotometar Specord 200 (AnalytikJena, Njemačka), spojen s osobnim računalom za prikupljanje podataka pomoću aplikacije WinASPECT PLUS.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka za analizu

Da bi se uzorak analizirao, potrebno ga je razrijediti, podesiti mu puferuski kapacitet te dodati bakrove ione radi stvaranja kompleksa s prisutnim prirodnim pigmentima i umjetnim bojilima. U tu se svrhu u odmjernu tikvicu volumena 100 mL dodaje 10 mL uzorka, 20 mL

Tablica 1. Prehrambena bojila korištena u radu.

Naziv bojila	E-broj	Molekulska formula	Strukturna formula
Azorubin	E122	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	
Amaranth	E123	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	
Ponceau 4R	E124	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	
Allura Red	E129	$C_{18}H_{14}N_2Na_3O_8S_2$	

otopine amonijeva klorida, množinske koncentracije $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 1,0 \text{ mol/L}$ i 20 mL smjese acetatnog formijatnog pufera ($\text{pH}=3,4$), množinske koncentracije $c(\text{CH}_3\text{COONa})=0,25 \text{ mol/L}$ i $c(\text{HCOONa}) = 0,25 \text{ mol/L}$, te se do oznake tikvica dopuni deioniziranom vodom. U alikvot volumena 20 mL tako priređene otopine potom se dodaje 200 μL otopine bakrovih(II) kationa, množinske koncentracije $c(\text{Cu}^{2+}) = 0,500 \text{ mol/dm}^3$, i takva otopina uzorka se koristi za analizu.

3.2.2. Provedba analize

Analiza uzorka provedena je postupnim povećavanjem pH uzorka dodatkom vodene otopine NaOH te snimanjem apsorpcijskog spektra uzorka nakon svakog dodatka NaOH. Da bi se potvrdila prikladnost 2D-korelacijske spektroskopije za detekciju prisutnosti umjetnih bojila u soku, potrebno je provesti identičan postupak analize uzorka bez dodatka bojila te uzorka s dodatkom bojila. Kod analize uzorka s bojom, u 20 mL uzorka dodaje se 100 μL otopine pojedinog bojila, koncentracije $\rho(\text{bojilo})= 0,1 \text{ g/L}$, prije prvog dodatka otopine NaOH. Tijekom analize dodaje se ukupno 30 obroka otopine NaOH volumena 10 μL . Prije prvog i nakon svakog dodatka NaOH snimljen je apsorpcijski spektar i zabilježena pH vrijednost uzorka. Apsorpcijski spektri snimani su s rezolucijom od 1 nm u području valnih duljina od 400 do 700 nm.

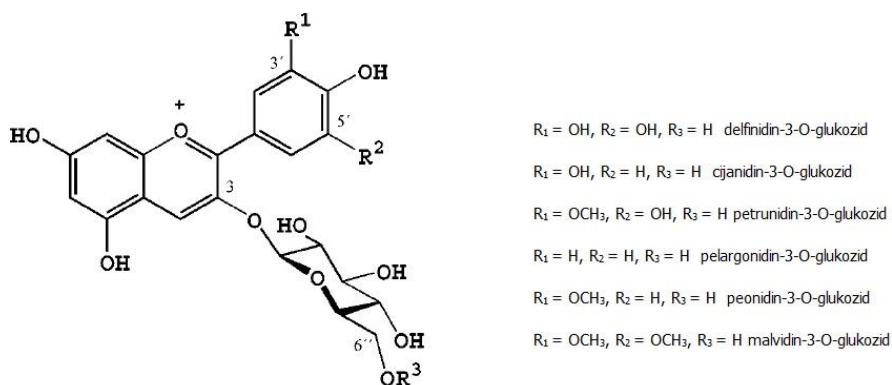
3.2.3. Obrada podataka

Izmjereni spektri pohranjeni su u ASCII formatu. Šum je iz spektara uklonjen filtriranjem Savitzky-Golayevom metodom, u aplikaciji Origin 8.1. (Microcall, USA). Filtrirani spektri su potom derivirani i raspoređeni prema rastućim pH vrijednostima u stupce matrice iz koje su se računali 2D-korelacijski spektri u aplikaciji MatLab 6.5 (MathWorks, USA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

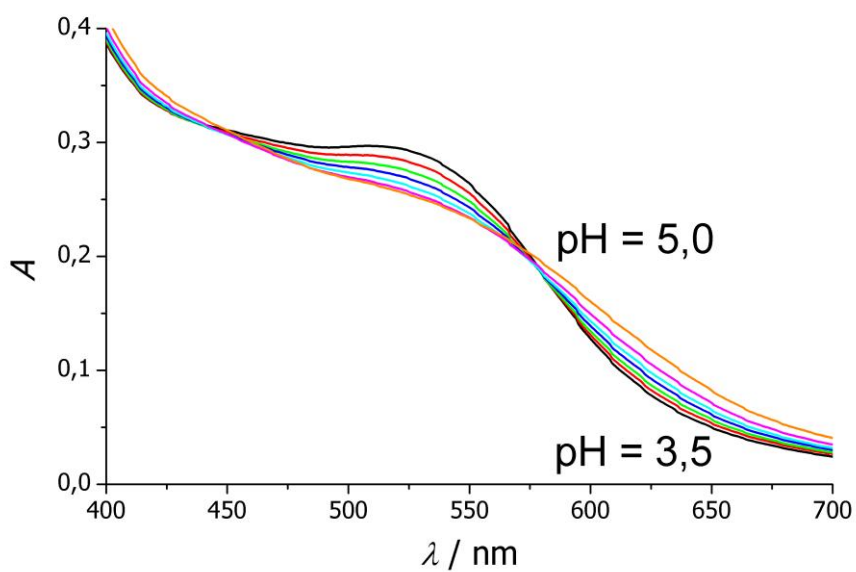
4.1. Preliminarna ispitivanja

Prirodni pigmenti iz uzorka soka crnog ribiza, kao što su pelargonidin, cijanidin, peonidin, delphinidin, petunidin i malvidin (prikazani na slici 3), sadrže funkcionalne skupine koje mogu disociirati, stoga se njihova boja (a samim time i apsorpcijski spektar u vidljivom području spektra) mijenja s promjenom pH vrijednosti (Slimestad R. i Solheim H., 2002). Ako uzorak sadrži umjetno bojilo čiji se apsorpcijski spektar s promjenom pH mijenja na drugačiji način od spektra prirodno prisutnih pigmenta, to se manifestira razlikama u spektralnim promjenama uzorka nepatvorenog soka i soka u koje je dodano umjetno bojilo. Razlike u spektralnim promjenama mogu biti vrlo diskretne ali i kao takve mogu se detektirati 2D korelacijskom spektroskopijom.

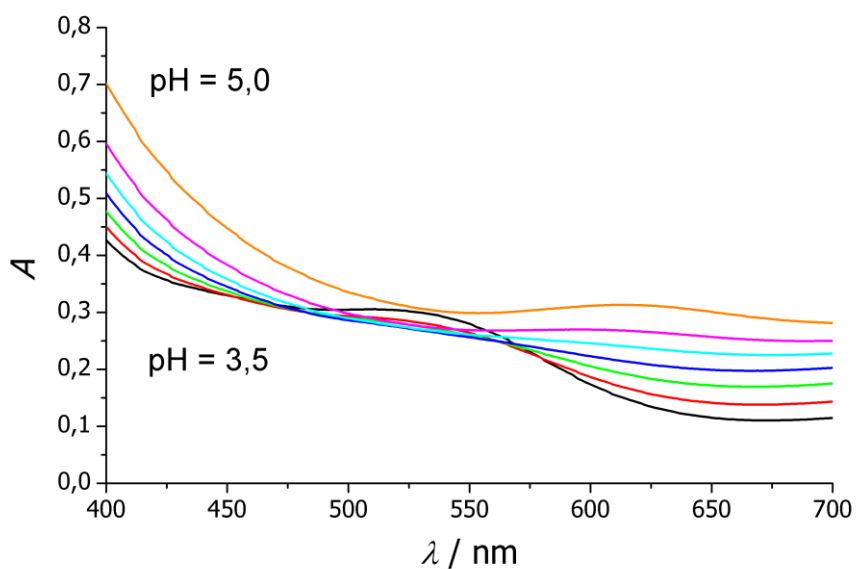


Slika 3. Strukturna formula nekkih antocijana prirodno prisutnih u crnom ribizu.

Na slici 4 prikazan je apsorpcijski spektar uzorka soka crnog ribiza snimljen u području valnih duljina od 400 do 700 nm, u području pH vrijednosti između 3,5 i 5,0. Iz snimljenih spektara vidljivo je da dolazi do izraženijih spektralnih promjena porastom pH vrijednosti u području od 450 do 570 nm, u kojem se apsorbancija uzorka smanjuje, te u području valnih duljina većih od 570 nm, u kojem se apsorbancija uzorka povećava. Na spektrima pri 450 i 575 nm uočava se izobestička točka koja ukazuje na postojanje dviju spektralnih vrsta u kemijskoj ravnoteži. Pojava izobestičke točke može se pripisati uspostavljenoj ravnoteži između protoniranog i neprotoniranog oblika antocijana prisutnih u soku (Fossen i sur., 1998).



Slika 4. VIS spektri uzorka soka crnog ribiza u području pH od 3,5 do 5,0.

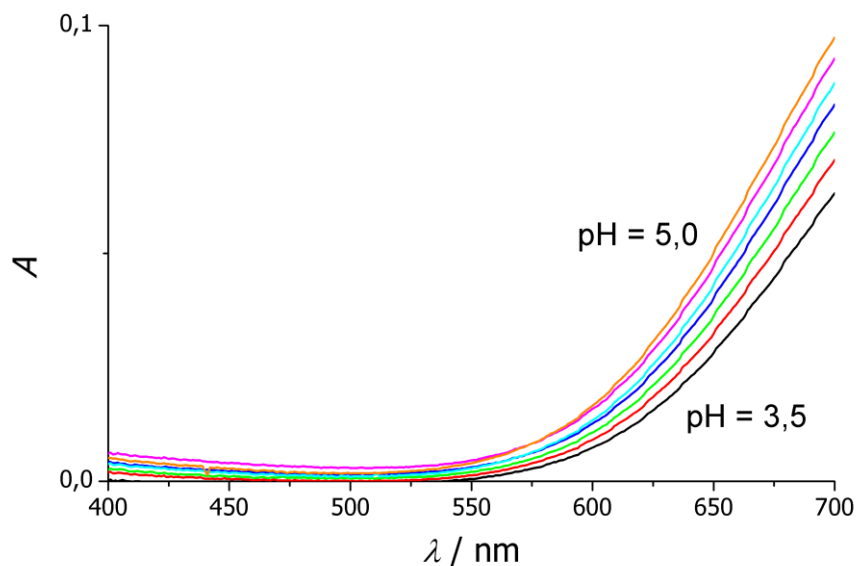


Slika 5. VIS spektri uzorka soka crnog ribiza u rasponu pH od 3,5 do 5,0.

Slika 5 prikazuje VIS spektar uzorka soka crnog ribiza nakon dodatka otopine bakrovih (II) kationa, snimljen u području valnih duljina od 400 do 700 nm, pri čemu se

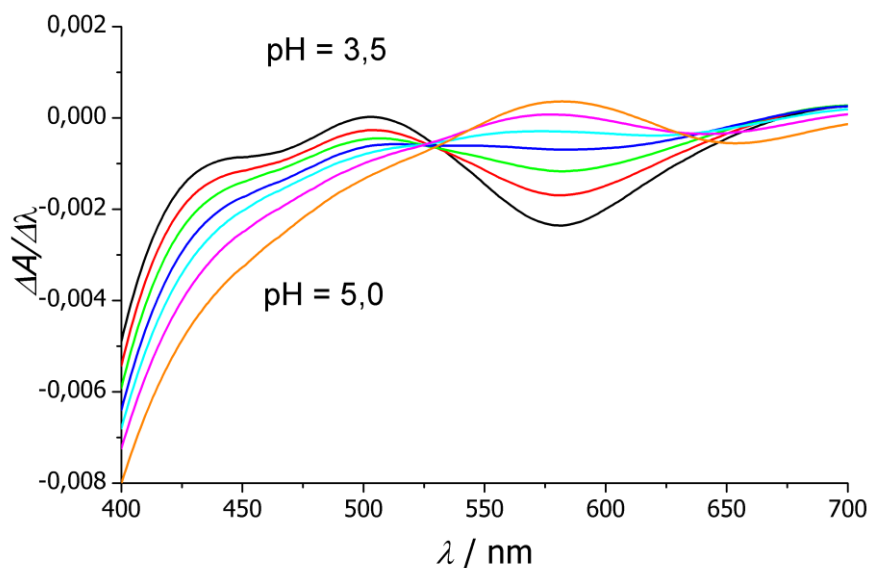
značajno pojačavaju spektralne promjene u području pH vrijednosti od 3,5 do 4,7. Bakrovi(II) kationi kompleksiraju s OH skupinama iz prirodno prisutnih pigmenata soka, pri čemu je ravnoteža nastajanja kompleksa ovisna o pH-vrijednosti.

U uzorke je dodan suvišak bakrovih (II) kationa, koji povećanjem pH vrijednosti daju amonijačni kompleks s amonijevim kationima, prisutnim radi povećanja puferskog kapaciteta u uzorku, koji apsorbira pri valnim duljinama većim od 550 nm (slika 6). U svim daljnjim mjerenjima kao slijepa proba korištena je vodena otopina amonijevog klorida, acetat/formijat pufera i bakrovog(II) kationa. Na slici 6 su prikazani spektri slijepa probe u području pH vrijednosti od 3,5 do 5,0.



Slika 6. VIS spektri uzorka slijepa probe u rasponu pH od 3,5 do 5,0.

Deriviranjem apsorpcijskog spektra, kako prikazuje slika 7, još se više mogu istaknuti spektralne promjene uočene u uzorcima u koje je dodan bakrov(II) kation. Uspoređujući slike 5 i 7 vidljivo je povećanje varijance podataka, čime se pridonosi povećanju intenziteta u 2D-korelacijskim spektrima. Zbog toga su u svim daljnjim mjerenjima iz izmjerenih apsorpcijskih spektara uzoraka izračunati derivirani spektri te dalje korišteni pri izračunavanju 2D-korelacijskih spektara.

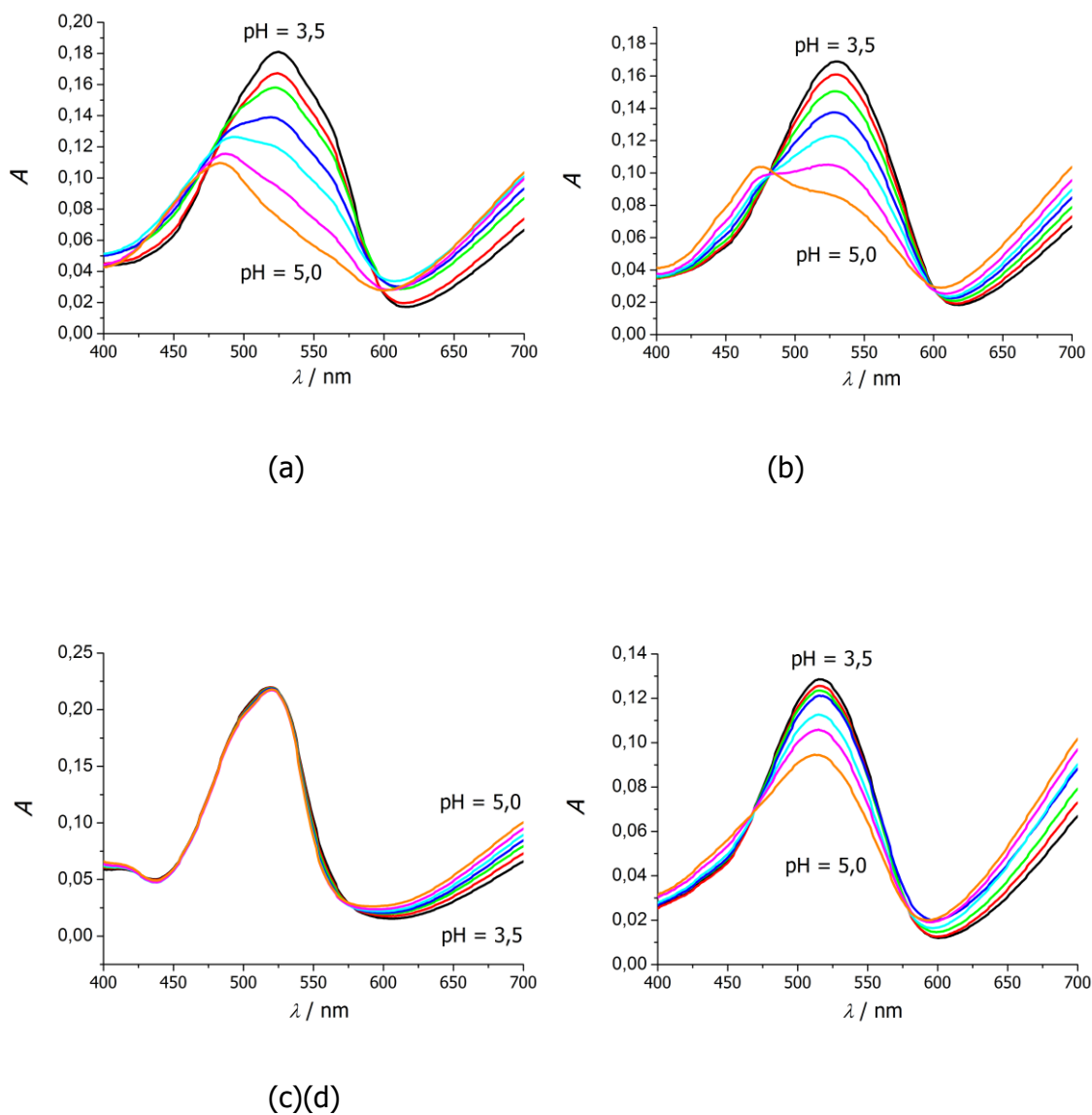


Slika 7. Derivirani VIS spektri uzorka soka crnog ribiza u rasponu pH od 3,5 do 5,0.

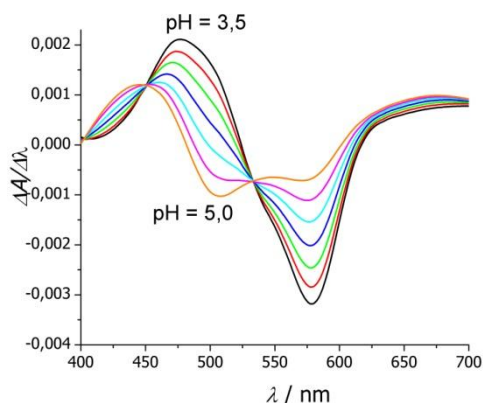
4.2. Spektroskopsko ponašanje bojila

U promatranom području vrijednosti pH, disocijacija azo-bojila se odvija na –OH funkcionalnim skupinama, što se uočava kao promjena boje i promjena apsorpcijskih spektara u vidljivom području. Na slici 8 prikazani su VIS spektri umjetnih bojila E122, E123, E124 i E129 snimljenih u području valnih duljina od 400 do 700 nm te u rasponu pH vrijednosti od 3,5 do 7,0. U promatranom pH-području u prisutnosti bakrovih(II) kationa bojila E122 i E123 pokazuju izražene spektralne promjene pri valnim duljinama od 450 nm do 540 nm, gdje porastom pH dolazi do smanjenja apsorbanacije, te pri valnim duljinama većim od 540 nm, gdje porastom pH dolazi do povećanja apsorbanacije. Kod bojila E124 i E129 spektralne promjene su slabije izražene, no i kod njih porastom pH vrijednosti u području valnih duljina od 450 nm do 560 nm za bojilo E124 i od 440 nm do 525 nm za bojilo E129 apsorbanacija opada, a raste pri 560 nm za bojilo E124 i pri 525 nm za bojilo E129. Promatrajući oblike spektara uočava se sličnost između bojila E122, E123 i E129, što se može povezati sa strukturnim sličnostima bojila (tablica 1). Bojila E122 i E123 imaju slično supstituirane ligande na naftalenskom prstenu koji kompleksiraju s bakrovim(II) kationom. Bojilo E124 vjerojatno stvara vrlo labilan kompleks sa bakrovim(II) kationom, ili ga uopće ne stvara, jer je kompleksiranje bakrovih(II) kationa s ligandima (na istom aromatskom prstenu)

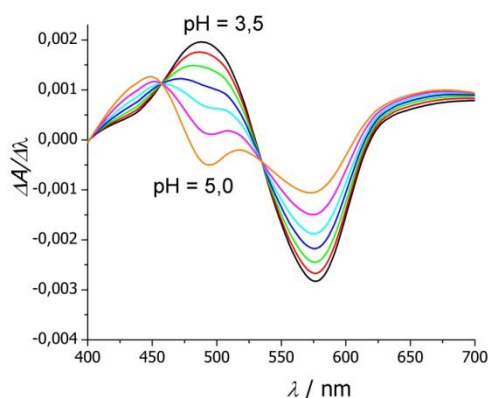
bojila E124 otežano zbog steričkih smetnji uzrokovanih prisutnošću sulfonske skupine u α -položaju prema azo skupini. Dobro vidljive spektralne promjene bojila u vidljivom dijelu spektra dodatno su istaknute deriviranjem spektara, prikazanima na slici 9.



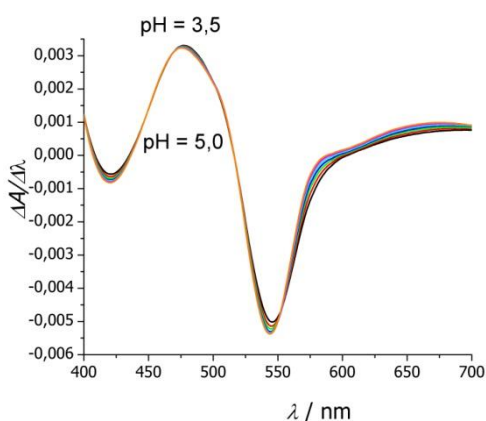
Slika 8. VIS spektri uzorka bojila (a) E122, (b) E123, (c) E124 i (d) E129 u smjesi s bakrom u rasponu pH od 3,5 do 5,0



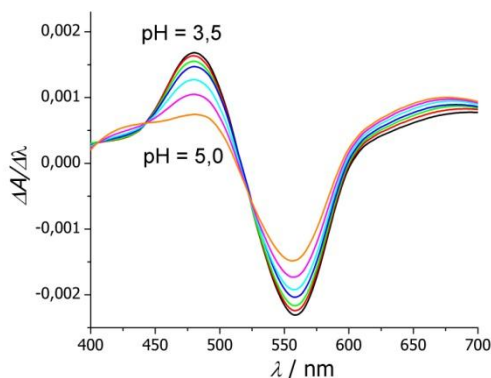
(a)



(b)



(c)



(d)

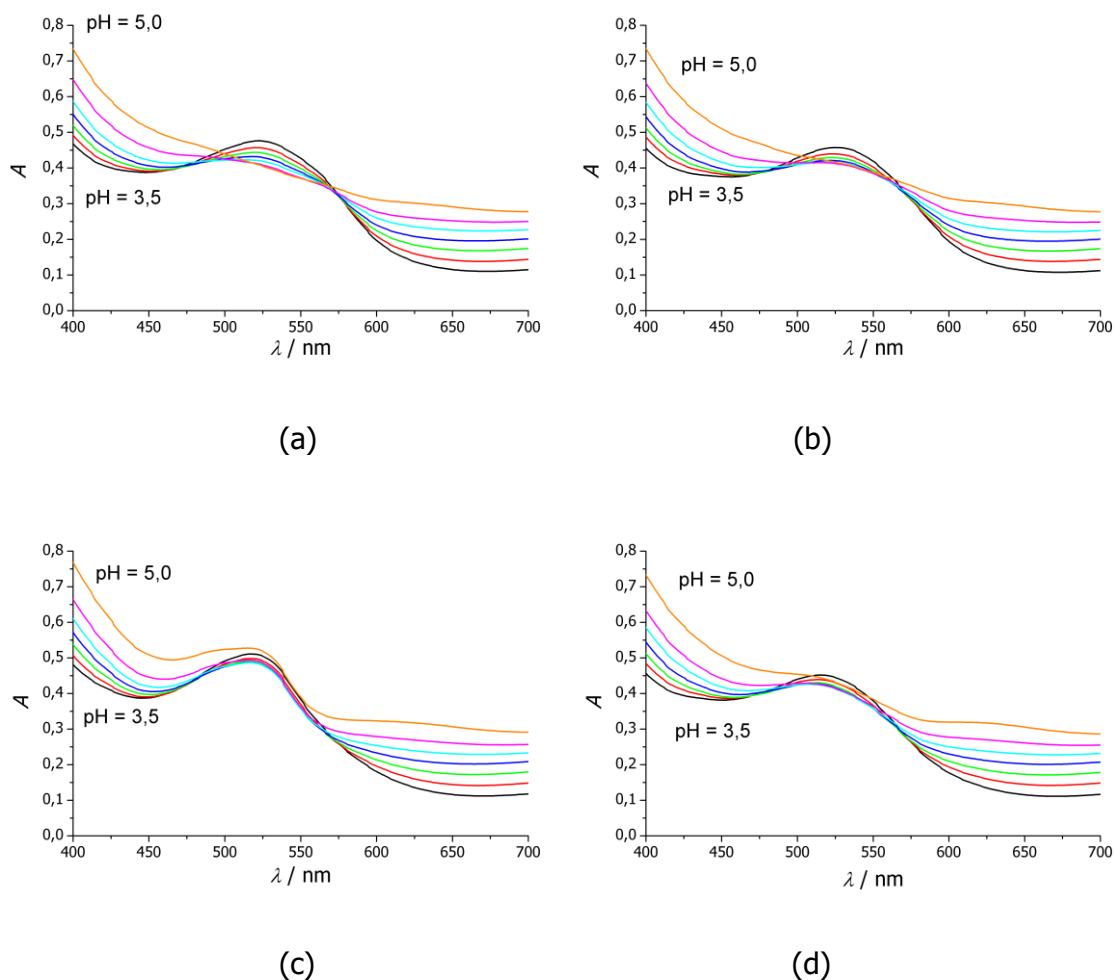
Slika 9. Derivirani VIS spektri uzorka bojila (a) E122, (b) E123, (c) E124 i (d) E129 u rasponu pH od 3,5 do 5,0

Uspoređujući spektralne promjene deriviranih spektara bojila s deriviranim spektrima uzorka soka uočavaju se izobestičke točke pri različitim valnim duljinama. Valne duljine kod kojih se javljaju izobestičke točke deriviranog spektra uzorka soka pomaknute su prema većim valnim duljinama (530 i 650 nm) u odnosu na valne duljine izobestičkih točaka deriviranog spektra bojila (oko 460 i 530 nm). Nakon prve izobestičke točke, porastom pH vrijednosti, dolazi do porasta $\Delta A/\Delta \lambda$ u deriviranom spektru soka, a smanjenja $\Delta A/\Delta \lambda$ u deriviranim spektrima bojila, a nakon druge izobestične točke, $\Delta A/\Delta \lambda$ u deriviranom spektru uzorka soka se smanjuje, a deriviranog spektra bojila ona raste. Zbog razlike između deriviranih spektara uzorka soka i samog bojila u prisutnosti bakrovih(II) kationa opravdano

je očekivati razliku u spektralnim promjenama uzorka koji sadrži dodano bojilo od spektralnih promjena uzorka bez dodanog bojila.

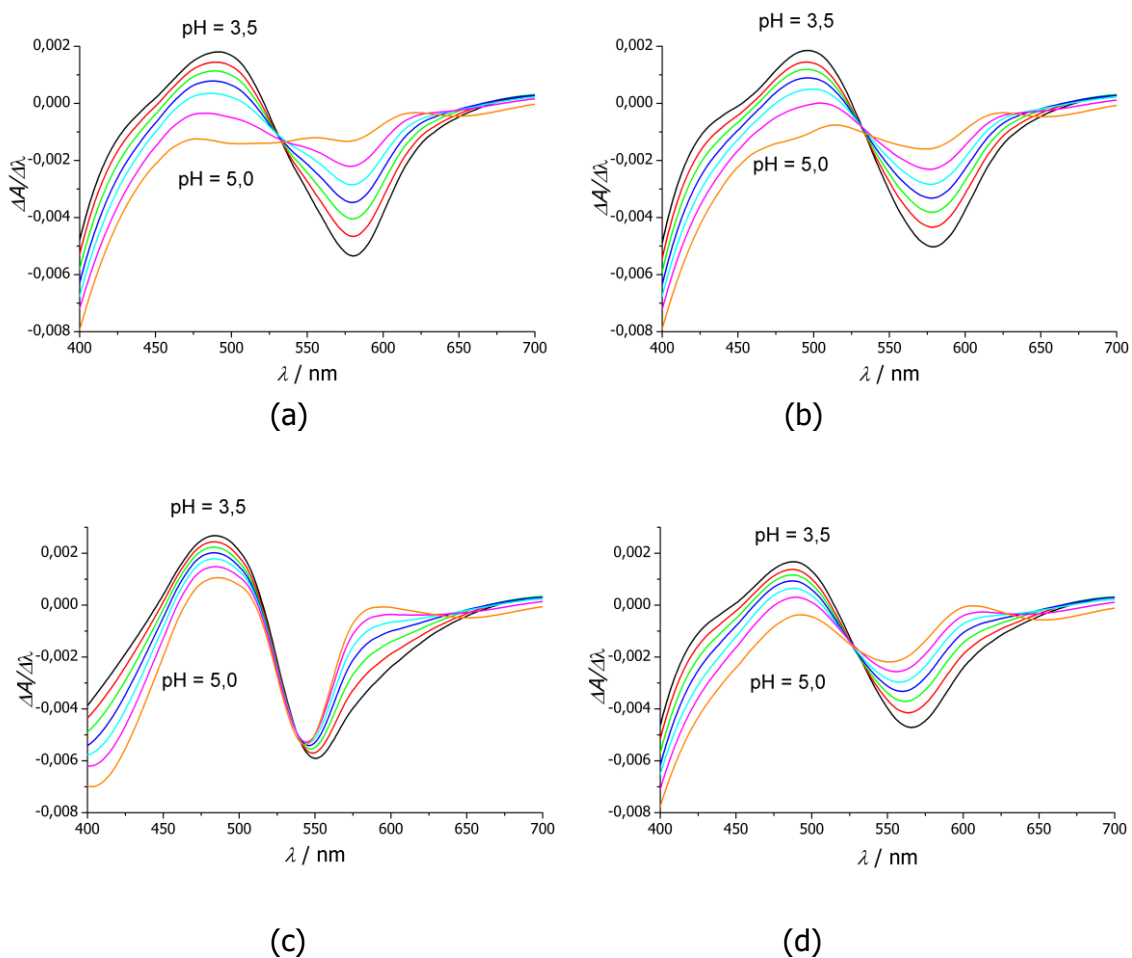
4.3. Spektroskopske promjene u uzorcima soka s dodanim bojilima

Kako bi se provjerila teza s kraja prethodnog poglavlja, priređena je smjesa uzorka za analizu opisana u poglavlju 3.2.2. i umjetnog bojila, te su snimani apsorpcijski spektri tijekom postupnog povećanja pH vrijednosti u području od 3,5 do 5,0. Dobiveni VIS spektri uzoraka soka s dodanim bojilima prikazani su na slici 10., a izračunati derivirani VIS spektri soka s dodanim bojilima na slici 11.



Slika 10. VIS spektri smjese uzorka soka s dodatkom bojila (a) E122, (b) E123, (c) E124 i (d) E129 u rasponu pH od 3,5 do 5,0

Na slici 10. prikazani su spektri smjese uzorka soka s bojilima E122, E123 i E129 u promatranom pH-području uz prisutnost bakrovih(II) kationa, koji pokazuju gotovo identične spektralne promjene, dok se spektri smjese uzorka soka i bojila E124 ponešto razlikuju od njih. Bojila E122, E123 i E124 pokazuju izražene spektralne promjene pri valnim duljinama od oko 450 nm do 570 nm, gdje porastom pH dolazi do smanjenja apsorbancije, te pri valnoj duljini od 570 nm, gdje porastom pH dolazi do povećanja apsorbancije. Kod bojila E124 spektralne promjene su slabije izražene, no i kod njih porastom pH-u vrijednosti u području valnih duljina od 450 nm do 570 nm apsorbancija opada, a raste pri 570 nm.



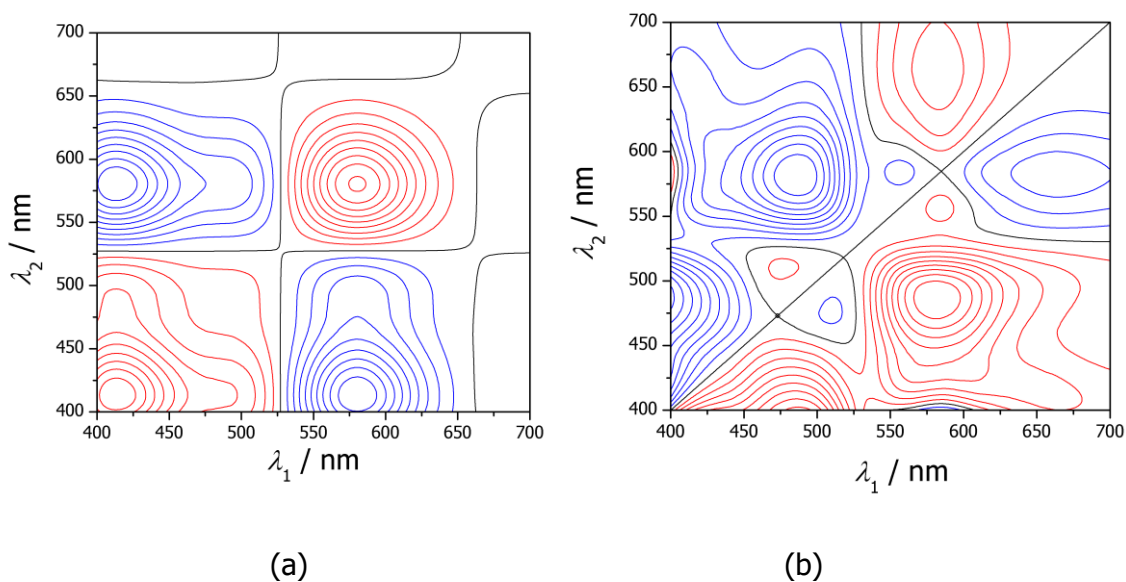
Slika 11. Derivirani VIS spektri smjese uzorka soka s dodatkom bojila (a) E122, (b) E123, (c) E124 i (d) E129 u rasponu pH od 3,5 do 5,0

U deriviranim spektrima svih uzoraka soka s dodanim bojilima (slika 11) karakteristično je da se pri valnim duljinama od 400 nm do 530 nm opažaju promjene slične spektralnim

promjenama u čistom uzorku soka, dok opažene promjene spektara pri valnim duljinama od 530 nm do 650 nm nalikuju čistim uzorcima bojila. Na temelju razlika deriviranih VIS spektara može se pretpostaviti da će 2D-korelacijski spektri čistih uzoraka soka i soka s dodanim bojilom u području valnih duljina od 400 do 530 nm pokazivati slične karakteristike, dok će se u području valnih duljina iznad 530 nm značajnije razlike pojavljivati.

4.4. 2D korelacijski spektri uzoraka

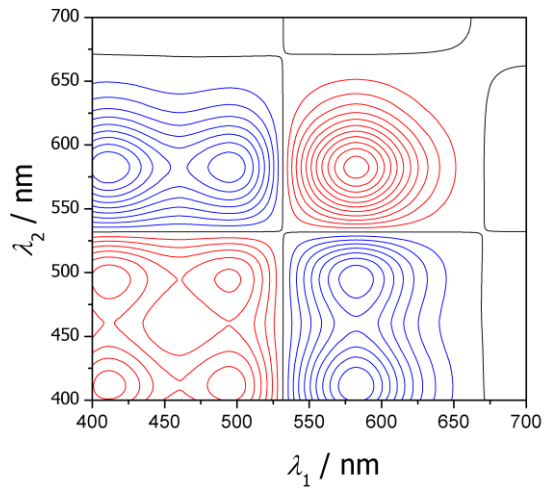
Derivirani VIS spektri korišteni su za izradu konturnih 2D-korelacijskih spektralnih mapa iz kojih se mogu uočiti diskretne razlike između uzorka soka i uzorka soka u koje je dodano bojilo.



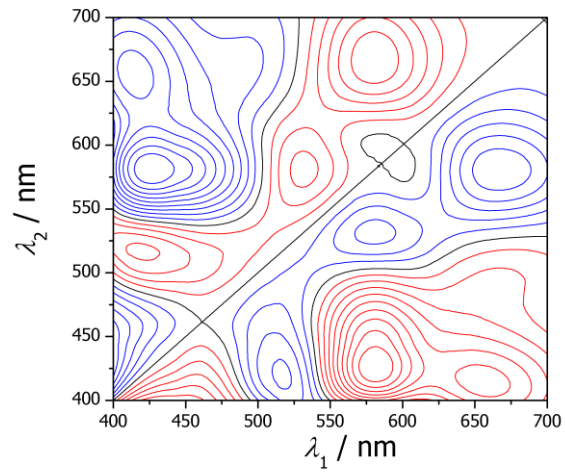
Slika 12. Konturni prikaz sinkronih (a) i asinkronih (b) 2D-korelacijskih spektara računatih na temelju deriviranih VIS spektara uzorka soka

Na sinkronom 2D-korelacijskom spektru (slika 12.a) uzorka soka opažaju se dva autokorelacijska maksimuma na dijagonali i jedan negativni korelacijski maksimum izvan dijagonale koji ukazuje da su pri valnoj duljini od 420 i 580 nm spektralne promjene obrnutog smjera. Detaljniji prikaz sa većim brojem apsorpcijskih maksimuma smještenih izvan dijagonale uočava se u asinkronom 2D-korelacijskom spektru (slika 12.b). Apsorpcijski maksimumi upućuju na to da se spektar dinamički mijenja, odnosno da promjena pri jednoj valnoj duljini prethodi ili kasni za promjenom pri drugoj valnoj duljini. Kod uzorka soka

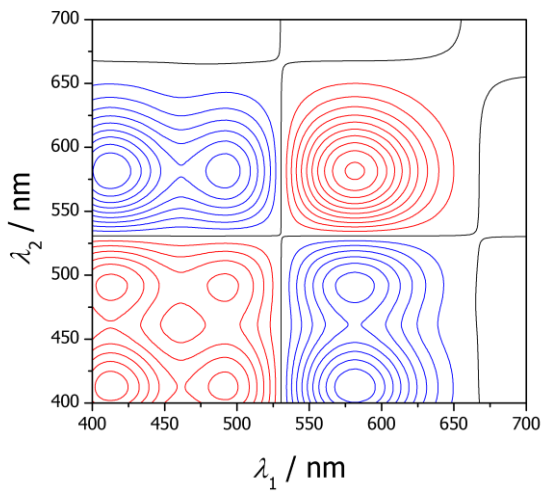
apsorpcijske maksimume nalazimo pri sljedećim valnim duljinama: 583, 665; 557, 583; 487, 581 i 478, 508 nm.



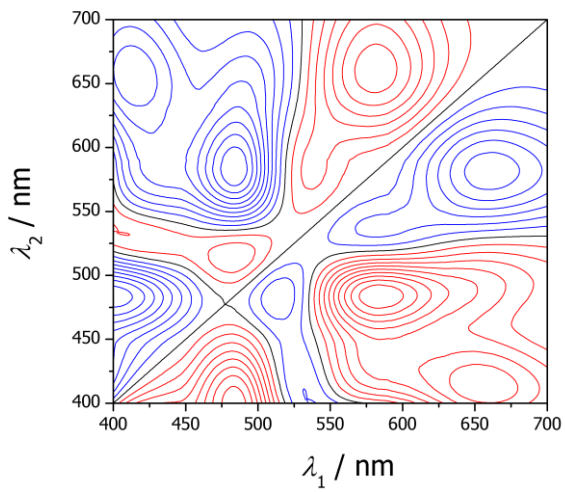
(a)_{E122}



(b)_{E122}

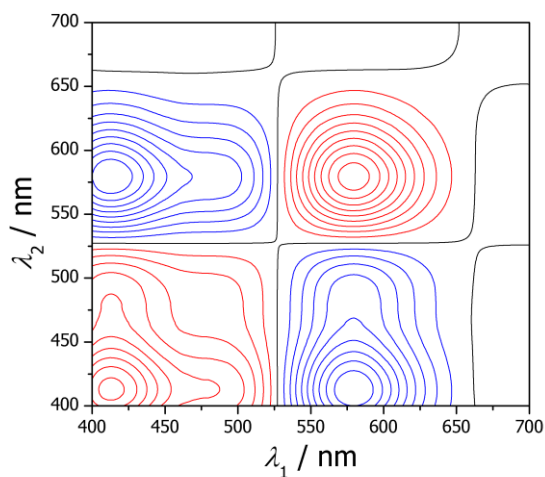


(a)_{E123}

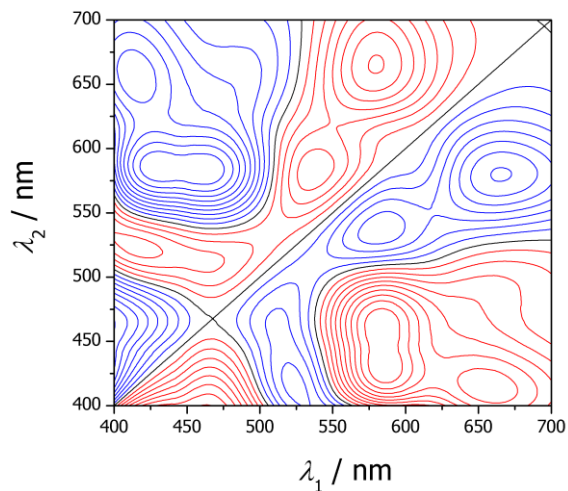


(b)_{E123}

Slika 13. Konturni prikaz sinkronih (a) i asinkronih (b) 2D-korelacijskih spektara računatih na temelju deriviranih VIS spektara uzorka soka uz dodatak bojila E122 i E123 (naznačeno u supskriptu).

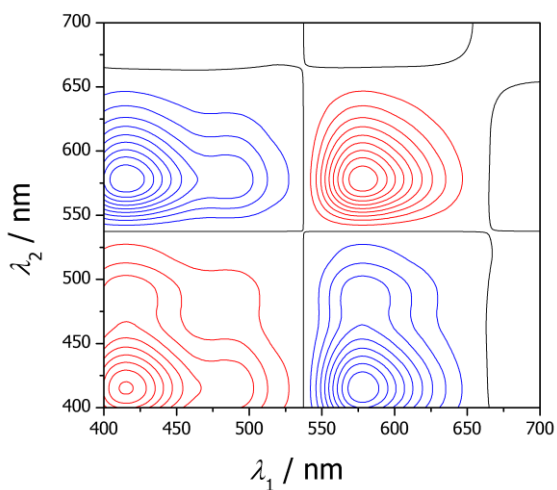


(a_{E129})

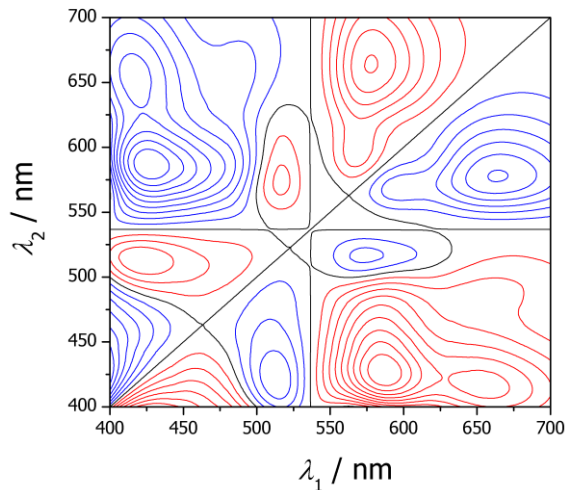


(b_{E129})

Slika 13.(nastavak) Konturni prikaz sinkronih (a) i asinkronih (b) 2D-korelacijskih spektara računatih na temelju deriviranih VIS spektara uzorka soka uz dodatak bojila E129 (naznačeno u supskriptu).



(a)



(b)

Slika 14. Konturni prikaz sinkronih (a) i asinkronih (b) 2D-korelacijskih spektara računatih na temelju deriviranih VIS spektara uzorka soka uz dodatak bojila E124.

Sinkroni 2D-korelacijski spektri uzorka soka uz dodatak bojila E122 (slika 13.a_{E122}) i E123 (slika 13.a_{E123}) razlikuju se od sinkronog 2D-korelacijskog spektra uzorka soka po većem broju autokorelacijskih maksimuma (bojilo E122 sadrži 3 autokorelacijska maksimuma; bojilo E123 sadrži 4 autokorelacijska maksimuma) inegativnih korelacijskih maksimuma izvan dijagonale (kod dodatka oba bojila vidljivi su pri valnim duljinama od 580, 420 nm i 580, 490 nm). U sinkronom 2D-korelacijskom spektru uzorka soka s bojilom E129 (slika 13.a_{E129}) i E124 (slika 14.a) ne uočava se spektralna promjena u odnosu na sinkroni 2D korelacijski spektar uzorka soka, međutim konturni prikaz asinkronog 2D-korelacijskog spektra uzorka soka s dodatkom bojila E129 (slika 13.b_{E129}) izgleda gotovo jednako kao i konturni prikaz asinkronog 2D-korelacijskog spektra uzorka soka s dodatkom bojila E122 (slika 13.b_{E122}) i E123 (slika 13.b_{E123}). Asinkroni 2D-korelacijski spektar uzorka soka s dodatkom bojila E124 (slika 14.b) razlikuje se po obliku kontura od ostalih bojila, no svi uzorci soka s dodatkom bojila sadrže više korelacijskih maksimuma pri valnim duljinama većim od 530 nm u odnosu na uzorak soka bez dodanog bojila, što potvrđuje pretpostavku s kraja prethodnog poglavlja. Svim asinkronim 2D-korelacijskim spektrima uzorka soka s dodatkom bojila zajednički je korelacijski maksimum pri valnoj duljini od 652 nm koji se može povezati s promjenama u deriviranim VIS spektrima uzorka soka s dodatkom bojila (slika 11).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja provedenih u ovom radu, može se zaključiti sljedeće:

1. Spektralne promjene uočene u vidljivom dijelu spektra (400-700 nm) tijekom promjene pH sokova od crnog ribiza, uzrokovane protolitičkim ravnotežama prirodnih pigmenata, mogu se značajno pojačati kompleksiranjem pigmenata s bakrovim(II) kationima te deriviranjem apsorpcijskih spektara.
2. U području pH od 3,5 do 5,0 i prisustvu iona Cu^{2+} , spektralno ponašanje umjetnih bojila E122, E123, E124 i E129 u području valnih duljina od 400 do 700 nm razlikuje se od spektralnog odziva sokova od crnog ribiza pri identičnim uvjetima.
3. Spektralni odziv sokova od crnog ribiza s dodanim umjetnim bojilima E122, E123, E124 i E129 razlikuje se od spektralnog odziva čistih sokova od crnog ribiza u području valnih duljina između 530 i 650 nm. Uočene spektralne razlike su diskretne, no mogu se pojačati dvodimenzijском (2D) korelacijskom spektroskopijom.
4. Asinkroni 2D-korelacijski spektri pružaju više informacija o spektralnim razlikama između uzoraka soka crnog ribiza s dodanim umjetnim bojilom i bez dodanog bojila od sinkronih 2D-korelacijskih spektara. Izrazite razlike u asinkronim korelacijskim mapama u području valnih duljina od 500 do 700 nm omogućuju jednoznačnu detekciju prisustva umjetnog bojila u soku crnog ribiza.
5. 2D-korelacijska spektroskopija u vidljivom dijelu spektra omogućuje brzu, jednostavnu i jeftinu detekciju prisustva umjetnih bojila u sokovima crnog ribiza.

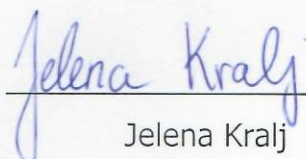
6. POPIS LITERATURE

1. Capitán-Vallvey L.F., Valencia M.C., Arana Nicolás E. (2002) Flow injection analysis with on-line solid phase Extracion for spectrophotometric determination of Ponceau 4R and its subsidiary unsulfonated dye in sweets and cosmetic products. *Microchim Acta* 138, 69-76.
2. Combeau S., Chatelut M., Vittori O. (2002) Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. *Talanta* 56, 115-122.
3. EFSA, European Food Safety Authority,
<<http://www.efsa.europa.eu/>> pristupljeno 19. lipnja 2018.
4. Fossen T., Cabrita L., Andersen M.O. (1998) Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Elsevier, Food Chemistry* 63, 435-440.
5. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations
<<http://www.fao.org/home/en/>> pristupljeno 19. lipnja 2018.
6. Hrvatska enciklopedija
<<http://www.enciklopedija.hr/Default.aspx>> pristupljeno 20. lipnja 2018.
7. Liu Y., Chen YR., Ozaki Y. (2000) Characterization of Visible Spectral Intensity Variations of Wholesome and Unwholesome Chicken Meats with Two-Dimensional Correlation Spectroscopy, *Applied Spectroscopy* 54 , 587–594.
8. Malien-Aubert C., Dangles O., Amiot M.J. (2001) Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 170-176.
9. Minioti KS., Sakellariou CF., Thomaidis NS. (2007) Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta* 538, 103-110.
10. Noda I. (1990) Two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy. Theory and applications, *Applied Spectroscopy* 44, 550–56Noda I., Dowrey A.E., Marcott C., Story G.M., Ozak Y. (2000) Generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 54, 236A–248A.

11. Noda I. (2006) Progress in two-dimensional (2D) correlation spectroscopy. *Elsevier, Journal of Molecular Structure* 799, 2-15.
12. Noda I. (2015) Techniques of two-dimensional (2D) correlation spectroscopy useful in life science research. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 4, 109–127.
13. Noda I., Ozaki Y. (2004) Two-Dimensional Correlation Spectroscopy – Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy. Wiley, Chichester, str. 15-38.
14. Perez-Urquiza M., Beltran J.L. (2001) Determination of the dissociation constants of sulfonated azo dyes by capillary zone electrophoresis and spectrophotometry methods. *Elsevier, Journal of Chromatography A*, 917, 331-336
15. Pravilnik o prehranbenim aditivima (2010), Narodne novine 62 (NN 62/2010).
16. Slimestad R., Solheim H. (2002) Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 3228-3231.
17. Wang S., Shen S., Xu H. (2000) Synthesis, spectroscopic and thermal properties of a series of azo metal chelate dyes. *Elsevier, Dyes and Pigments* 44, 195-198.
18. You Z., Zhuo L., Yang X., Hong H., Liu Z., Gong Z., Cheng F. (2015) Food Research Applications of Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* 50, 840-858.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Jelena Kralj