

Određivanje umjetnog bojila (sunset yellow) u prehrambenim proizvodima

Lebo, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:421716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (SUNSET YELLOW) U
PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

DIPLOMSKI RAD

ANJA LEBO

Matični broj: 148

Split, listopad, 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
Smjer: ZAŠTITA OKOLIŠA

ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (SUNSET YELLOW) U
PREHRAMBENIM PROIZVODIMA
DIPLOMSKI RAD

ANJA LEBO

Matični broj: 148

Split, listopad, 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ENVIRONMENTAL PROTECTION

**DETERMINATION OF ARTIFICIAL DYES (Sunset Yellow) IN FOOD
PRODUCTS**

DIPLOMA THESIS

ANJA LEBO

Parent number: 148

Split, October, 2016.

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Diplomski studij kemijske tehnologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na IV. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Maša Buljac

Pomoć pri izradi: dr. sc. Nives Vladislavić

**ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (SUNSET YELLOW) U PREHRAMBENIM
PROIZVODIMA**

Anja Lebo broj indeksa: 148

Sažetak: U ovom diplomskom radu određivane su koncentracije umjetnog bojila Sunset Yellow (SY), u raznim prehrambenim proizvodima, spektrofotometrijskom UV/Vis i voltometrijskom metodom. Usporedbom dobivenih rezultata pomoću ovih dviju metoda moguće je ocijeniti relevantnost pojedine metode za analitičko određivanje SY. Spektrofotometrijskim mjerenjima SY je određivan pri dvije pH vrijednosti i to pri pH 7 (u čistoj vodi), te pri pH 4 (pH je prilagođen dodatkom limunske kiseline) kod valne duljine od 484 nm. Koncentracije u tekućim uzorcima, utvrđene ovom metodom, su se kretale u intervalima od 15,36 mg/L – 35,52 mg/L, dok su se u krutim uzorcima kretale od 39,82 mg/kg - 240,7 mg/kg.. Za voltometrijska mjerenja su korištene dvije metode: ciklička voltometrija (CV) i pravokutnovalna voltometrija.

Dobivene koncentracije tekućih uzoraka, koristeći voltometrijske metode, su se nalazile u intervalu od 14,5 mg/L – 26,3 mg/L, dok su se koncentracije krutih uzoraka nalazile u intervalu od 7 mg/kg – 48 mg/kg.

Ključne riječi: Azo bojila, Sunset Yellow, Spektrofotometrija, Voltometrija, Ciklička voltometrija, Pravokutnovalna voltometrija

Rad sadrži: 61 stranica, 25 sliki, 12 tablica, 0 priloga, 20 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. doc. dr. sc. Marija Bralić – predsjednik komisije
2. doc. dr. sc. Marijo Buzuk
3. doc. dr. sc. Maša Buljac - mentor

Datum obrane: 18.10.2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Graduate study of chemical technology

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of faculty of Chemistry and technology, session no.IV

Mentor: Maša Buljac, PhD, assistant prof.

Technical assistance: Nives Vladislavić, PhD

DETERMINATION OF ARTIFICIAL DYES (Sunset Yellow) IN FOOD PRODUCTS

Anja Lebo, index number: 148

Abstract: In these thesis artificial dyes Sunset Yellow is determined in food products; with Spectrophotometric UV/Vis method and with voltammetric method. Comparing final results with those two methods it is possible to evaluate relevance each method for analytic determination of SY. With spectrophotometric measurements SY was determined at two pH values, at pH=7 (in pure water) and at pH≈4 (pH is adjusted with addition of citric acid) at wavelength 484 nm. Concentrations in liquid samples, determinates with this method were inside interval 15.36 mg/L – 35.52 mg/L while in solid samples was between 39.82 mg/kg – 240.7 mg/kg . For voltammetric measurements two methods were used, cycle voltammetric and square wave voltammetric. The resulting concentration of liquid samples using voltammetric method were in the interval from 14.5 mg/L – 26.3 mg/L, while concentration of solid samples were in the interval 7 mg/kg – 48 mg/kg.

Key words: Azo dyes, Sunset Yellow, Spectrophotometric, Voltammetric, Cyclic Voltammetry, Square wave voltammetric

Thesis contains: 61 pages, 25 figures, 12 tables, 0 insets, 20 literature references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Marija Bralić, PhD associate prof., Chair person
2. Marijo Buzuk, PhD assistant prof., Member
3. Maša Buljac, PhD assistant prof., Supervisor

Defence date: 18.10.2016.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za Kemiju okoliša i u Zavodu za Opću i anorgansku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Maše Buljac i uz pomoć dr. sc. Nives Vladislavić, u razdoblju od lipnja do listopada, 2016.god.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Maši Buljac i dr. sc. Nives Vladislavić na stručnoj pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na razumijevanju i pruženoj podršci tijekom studija.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada je određivanje umjetnog bojila (Sunset Yellow) u prehrambenim proizvodima UV/Vis spektrofotometrijom i voltametrijom.

Dobivene rezultate usporediti te predložiti metodu za određivanje umjetnog bojila u prehrambenim proizvodima.

SAŽETAK

ODREĐIVANJE UMJETNOG BOJILA (SUNSET YELLOW) U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

U ovom diplomskom radu određivane su koncentracije umjetnog bojila Sunset Yellow (SY), u raznim prehrambenim proizvodima, spektrofotometrijskom UV/Vis i voltometrijskom metodom. Usporedbom dobivenih rezultata pomoću ovih dviju metoda moguće je ocijeniti relevantnost pojedine metode za analitičko određivanje SY. Spektrofotometrijskim mjerenjima SY je određivan pri dvije pH vrijednosti i to pri pH 7 (u čistoj vodi), te pri pH 4 (pH je prilagođen dodatkom limunske kiseline) kod valne duljine od 484 nm. Koncentracije, u tekućim uzorcima, utvrđene ovom metodom, su se kretale u intervalima od 15,36 mg/L – 35,52 mg/L, dok su se u krutim uzorcima kretale od 39,82 mg/kg - 240,7 mg/kg. Za voltometrijska mjerenja su korištene dvije metode: ciklička voltometrija (CV) i pravokutnovalna voltometrija. Dobivene koncentracije tekućih uzoraka, koristeći voltometrijske metode, su se nalazile u intervalu od 14,5 mg/L – 26,3 mg/L, dok su se koncentracije krutih uzoraka nalazile u intervalu od 7 mg/kg – 48 mg/kg.

Ključne riječi: Azo bojila, Sunset Yellow, Spektrofotometrija, Voltometrija, Ciklička voltometrija, Pravokutnovalna voltometrija

ABSTRACT

DETERMINATION OF ARTIFICIAL DYES (Sunset Yellow) IN FOOD PRODUCTS

In this thesis artificial dyes Sunset Yellow is determined in food products; with Spectrophotometric UV/Vis method and with voltammetric method. Comparing final results with those two methods it is possible to evaluate relevance from each method for analytic determination SY. With spectrophotometric measurements SY was determined at two pH values, at pH=7 (in pure water) and at pH≈4 (pH is adjusted with addition of citric acid) at wavelength 484 nm. Concentrations in liquid samples, determinates with this method were inside interval 15.36 mg/L – 35.52 mg/L while in solid samples was between 39.82 mg/kg – 240.7 mg/kg. For voltammetric measurements two methods were used, cycle voltammetric and square wave voltammetric. The resulting concentration of liquid samples using voltammetric method were in the interval from 14.5 mg/L – 26.3 mg/L, while concentration of solid samples were in the interval 7 mg/kg – 48 mg/kg.

Key words: Azo dyes, Sunset Yellow, Spectrophotometric, Voltammetric, Cyclic Voltammetri, Square wave voltametric

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Bojila.....	3
1.1.1. Podjela bojila	3
1.1.2. Umjetna bojila	4
1.1.3. Azo bojila	5
1.2. Sunset Yellow	7
1.2.1. Kemijska struktura Sunset Yellow	7
1.2.2. Sunset Yellow u namirnicama.....	8
1.2.3. Utjecaj Sunset Yellow na ljudsko zdravlje	9
1.3. Metode određivanja	10
1.3.1. Spektroskopija	10
1.3.2. Voltometrija	12
1.3.2.1. Ciklička voltometrija.....	13
1.3.2.2. Pravokutnovalna voltometrija (Square wave).....	15
1.3.3. Staklasti ugljik (Glassy carbon).....	16
1.3.4. Referentna elektroda.....	17
1.3.5. Protuelektroda.....	18
2. EKSPERIMENTALNI DIO	19
2.1. Priprava otopina	20
2.1.1. Priprava otopine standarda Sunset Yellow	20
2.1.2. Priprava otopine limunske kiseline.....	20
2.1.3. Priprava natrijeva acetata.....	20
2.1.4. Priprava octene kiseline.....	20
2.1.5. Priprava otopine kalijeva nitrata.....	20
2.1.6. Priprava acetatnog pufera	21
2.2. Spektrofotometrijska metoda	21
2.2.1. Metodika	21
2.2.2. Postupak pripreme uzoraka	21
2.3. Voltometrijske metode	23
2.3.1. Metodika.....	23
2.3.2. Postupak pripreme elektroda (Glassy carbon elektroda).....	23

2.3.3. Priprema ćelije za elektrokemijsko mjerenje	24
3. REZULTATI I RASPRAVA	25
3.1. Spektrofotometrijska metoda određivanja Sunset Yellow-a.....	26
3.1.1. Scan Sunset Yellow-a pri pH=7	26
3.1.2. Scan Sunset Yellow-a pri pH≈4	30
3.2. Voltametrijske metode određivanja Sunset Yellow-a.....	32
3.2.1. Ciklička voltometrija	32
3.2.2. Rezultati analitičke primjene	36
4. ZAKLJUČAK	45
5. LITERATURA.....	47

UVOD

Krajem 19. st. je sintetizirano dosta bojila. Naime, mali broj bojila je prirodnog porijekla. U većini slučajeva, bojila su sintetičke imitacije prirodnih tvari ili su u potpunosti sintetički spojevi.¹ Sintetska bojila su se koristila kako bi namirnice izgledale privlačnije te kako bi zadržale prirodnu boju tijekom procesa ili skladištenja. Međutim, određena sintetska bojila mogu biti patogena, osobito ako se pretjerano konzumiraju. Upravo zbog toga su potrebni zakoni i propisi koji kontroliraju korištenje sintetičkih bojila u namirnicama.² Ova grupa spojeva zakonski se dodaje hrani od 1880. god.³

Razlikujemo mnoge vrste sintetskih bojila, a ono što im je zajedničko je to da obično sadrže azo skupinu i strukturu aromatskog prstena.⁴ Azo bojila se smatraju kontroverznim dodatcima, koja mogu često izazvati i alergijske reakcije.¹ Spojevi azo bojila koji dođu u dodir s okolišem, jamče veliku zabrinutost, upravo zbog svoje toksičnosti, mutagenosti i kancerogenosti.

U većini zemalja je njihova upotreba strogo ograničena, pa je od velike važnosti analizirati njihov sadržaj u tvarima u kojima se nalaze.⁴ Na samom početku razvoja za određivanje bojila u prehrambenim proizvodima, koristila se kromatografija na papiru. Međutim posljednjih 20 godina, postoje određene metode pomoću kojih se određuje sadržaj bojila u uzorcima, a neke od njih su:

- Spektrofotometrija
- Elektrokemijske metode
- Visoko tlačna tekućinska kromatografija
- Kapilarna elektroforeza, itd.

Većina metoda se koristi za određivanje bojila u pićima, dok je hranu potrebno adekvatno pripremiti za određivanje pojedinom metodom.⁵

Elektrokemijske metode mogu se koristiti za SY u širokom području potencijala na osnovu redukcije ili oksidacije SY na odgovarajućem potencijalu. U tu svrhu razvijen je niz modificiranih elektroda s vrlo niskim granicama detekcije. Njihova priprema je često komplicirana i uključuje materijale koji zbog svoje otrovnosti nisu poželjni, npr. elektrode koje sadrže živu.

1.1. Bojila

Bojila su tvari koje u vidljivom dijelu spektra apsorbiraju svjetlost i koja se na različite materijale vežu fizičkim silama. Sve obojene tvari apsorbiraju dio vidljivog svjetla, u području valne duljine od 400 – 800 nm. Prema tome je obojenje rezultat interakcije svjetla i materije. Da bi ta interakcija bila razumljiva, najprije je potrebno objasniti što je svjetlo. Svjetlo je naime, dio elektromagnetskog zračenja, koje ljudsko oko zapaža. Elektromagnetsko zračenje se giba u obliku valova. Obojenost ovisi o preostalom dijelu svjetlosti, koje određene tvari propuštaju ili difuzno reflektiraju. Također ovisi i o kemijskoj strukturi molekula tvari, odnosno o broju i razmještaju dvostrukih veza i kromoforu.

Bojila su organske molekule, koje da bi bile topljive u vodi, moraju sadržavati hidrofilne skupine poput karboksilne (-COOH) i sulfonske (-SO₃H).

Njemački kemičar Otto Witt je otkrio kromoforne grupe, a to su obojene tvari koje sadrže konjugirane sustave benzenskih prstenova s jednostavnim nezasićenim grupama, koje su vezane na njih. Kromoforne grupe su „nositelji obojenosti“ i razlikujemo neke od njih, a to su: etilenska, azo, azometinska, karbonilna, nitrozo, nitro, azoksi i kinoidna. Hidroksilne skupine (-OH) i aoksokromna grupa (-NH₂) omogućavaju vezivanje bojila na određenu tvar, upravo zbog nastajanja kemijske veze između bojila i određene tvari.^{6,7}

1.1.1. Podjela bojila

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

Bojila su na osnovu kemijskog karaktera podijeljena u sljedeće grupe:

- nitrozo
- nitro
- azo: monoazo, diazo, poliazo
- pirazolonska
- tiazolna
- trifenilmetanska
- ketonimidna

- ksantenska
- antrakinonska
- kinoniminska
- akridinska
- kinolinska
- sumporna
- indigoidna

Od ovdje navedenih skupina, najveću i najraznovrsniju skupinu umjetnih organskih bojila čine azo bojila.

Sintetska bojila prema svojstvima dijelimo na:

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

Gotovo sve boje koje se danas rabe u komercijalne svrhe su sintetskog podrijetla, čime se postiglo zadovoljenje kriterija ekonomske isplativosti, uz poboljšanje postojanosti boja i učinkovitosti bojenja.⁸

Osim što razlikujemo prirodna i umjetna bojila, možemo ih također klasificirati i na osnovu nositelja boje, tj. kromofora. Dakle, kromofor Polymethin bojila je npr. nerazgranati lanac konjugiranih dvostrukih veza. Kromofor azo bojila je azo grupa, gdje su dva atoma dušika povezana dvostrukim vezama i kromofor bojila trifenilmetan je atom ugljik s tri na njemu vezana fenil radikala.⁷

1.1.2. Umjetna bojila

Krajem 19. stoljeća započelo se sa prvim sintezama umjetnih bojila. Nakon toga je došlo do razvoja sve većeg broja umjetnih bojila, što je s tržišta potisnulo prirodna bojila. Uporaba sintetskih bojila je bila sve češća, upravo zato što su bila višestruko jeftinija od prirodnih bojila. Razvitak novih umjetnih bojila pridonio je gospodarskom rastu kemijske industrije.⁷ Umjetna bojila imaju svojstva da se lakše vežu na površinu tvari koja se boji. Danas razlikujemo preko 9000 različitih bojila s 50000 komercijalnih

imena. Razvoju strukturne organske kemije bitno je pridonijela industrija bojila. Brojna bojila su dobivena iz katrana. U proizvodnji novih bojila, od velikog je značaja bilo poznavanje strukture prirodnih bojila. Struktura prirodnih bojila je bila poznata upravo zbog poznavanja prirode benzenskog prstena i otkrića četverovalentnosti ugljika u organskim spojevima.

Bojila dobivena sintetskim putem se primjenjuju u medicini, industriji bojila, u proizvodnji gume, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kemijskoj industriji i u proizvodnji plastičnih masa. Kako raste proizvodnja umjetnih bojila tako se povećava i ugroženost ljudi i okoliša. Istraživanja su pokazala da toksičnost bojila ovisi o broju benzenovih prstenova u strukturi molekula. Naime, svako novo dobiveno bojilo mora proći evaluaciju da bi se moglo utvrditi koliko je ono upravo štetno za zdravlje ljudi i za okoliš.⁶

1.1.3. Azo bojila

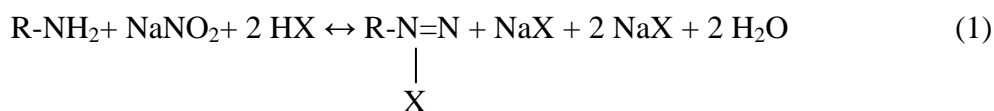
Azo bojila spadaju u novosintetizirane ksenobiotike, koji su teško razgradljivi u prirodi. Azo boje s 2000 strukturno različitih spojeva, te udjelom od 70%, najveća su, najvažnija i najraznolikija skupina umjetnih boja koje su u širokoj industrijskoj primjeni.⁸ Ova skupina umjetnih bojila sadrži jednu ili više kovalentnih veza između dva atoma dušika (-N=N-), aromatskih prstenova, uz prisutnost auksokromnih, hidroksilnih, sulfonskih ili amino skupina. Ovisno o broju sadržanih azo skupina, azo bojila dijelimo na : monoazo, diazo, triazo, tetreazo i poliazo.

Azo bojila se najčešće koriste u tekstilnoj industriji, u industriji plastičnih masa, industriji papira i kože. Ove boje se mogu podijeliti na boje topljive u mastima, mineralnim uljima, alkoholu i organskim otapalima. Za bojanje mineralnih ulja, masti, naftnih derivata, voskova i prehrambenim proizvoda, koriste se azo bojila koja nisu topljiva u vodi.⁸

Kod azo bojila postoji širok raspon tonova, međutim najviše se koriste bojila koja daju narančasto, žuto i crveno obojenje. Do ovih obojenja se dolazi apsorpcijom pri kraćim valnim duljinama. Ova bojila posjeduju dobra tehnička svojstva i postojana su na toplinu, vodu, otapala i svjetlo.⁹

Postupak dobivanja ovih bojila je s ekonomskog gledišta dosta isplativ. Sinteza azo bojila se odvija u dva stupnja, reakcijama diazotacije (vodena otopina ili suspenzija nekog aromatskog amina reagira sa otopinom natrijeva nitrita i kloridne kiseline¹⁰)

i diazokopulacije, pri čemu dolazi do spajanja dviju organskih komponenata: diazo komponente i kopulacijske komponente.⁹ Općenito reakciju se može prikazati kao:¹⁰



Specifičnosti reaktanata korištenih u ovim reakcijama omogućuju dobivanje najrazličitijih azo bojila, što objašnjava njihovu strukturalnu modifikaciju kako bi se dobila zadovoljavajuća obojenja prilikom njihove primjene.⁹ Pomoću ovoga se procesa direktno dobiva željeni spoj sa minimalnim energijskim zahtjevima, tj. reakcije se odvijaju pri sobnoj temperaturi. Za sintezu se koriste aromatski fenoli i amini, a kao otapalo se koristi voda, koja je za okoliš najprihvatljivija.⁹

Bojenjem različitih tvari, više od 10% azo bojila se ne uspije vezati na vlakna, što postaje ujedno i veliki problem za okoliš. Većina ovih bojila je toksična, kancerogena i imaju sposobnost izazivanja alergijskih reakcija kod ljudi. Ovisno o strukturi same molekule i mehanizmu razgradnje, može se odrediti kancerogenost određenog bojila, što je vidljivo iz *Tablice 1*.

Tablica 1. Ovisnost kancerogenosti azo-boja o svojstvima.⁸

Struktura	Topljivost	Mehanizam razgradnje	Kancerogenost
Diazo-sastavnica	Voda ili organsko otapalo	a) redukcija -N=N b) N-oksidacija amina	+
Azo-veza ostaje Sačuvana	Organsko otapalo	Oksidacija prstena N-dealkilacija N-oksidacija	+/-
Sulfonske skupine	Voda	Redukcija -N=N-	-

Struktura azo bojila se sastoji od azo veza koje se uglavnom nalaze unutar naftalenskog ili benzenovog prstena.⁸ Azo veza (-N=N-) je vezana na dva sp² hibridizirana C-atoma.⁹ Ove veze se u određenim slučajevima mogu naći i između aromatskih prstenova i na njih vezanih alifatskih enoliziranih skupina.⁸

Redukcijom azo bojila koja sadrže slobodne amino skupine, dolazi do cijepanja i nastajanja aromatskih amina. Upotreba aromatskih amina nije ekološki prihvatljiva, pa je iz toga razloga zabranjena. U organizmu sisavaca lako dolazi do enzimske razgradnje, zbog azo veza koje su najslabiji dio molekule. Naime, do redukcije azo bojila dolazi zbog sadržaja bakterija u probavnom traktu. Kao produkti redukcije azo bojila u

organizmu, nastaju kancerogeni aromatski amini, koji se apsorbiraju u crijevima, vežu se za DNA i potom uzrokuju stvaranje tumora i mutacije. Aromatski amini također uzrokuju slabost i vrtoglavicu, iz razloga što dolazi do oksidacije željeza hemoglobina (Fe^{2+} u Fe^{3+}), a to blokira vezanje kisika.⁹

Nitro, metilne, metoksi skupine i halogeni elementi povećavaju toksičnost bojila, dok karboksilne i sulfo skupine uglavnom smanjuju štetnost.²

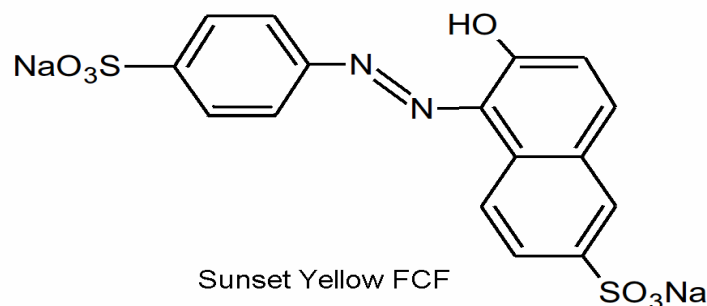
Ova bojila predstavljaju opasnost za okoliš, upravo zbog svoje nepotpune razgradnje, pri čemu produkti koji nastaju mogu dovesti i do povećanja njegove toksičnosti. Zbog toga je bitno razjasniti da za uklanjanje toksičnosti toga bojila nije bitno samo ukloniti obojenje, već je potrebno napraviti ekotoksikološke testove. Azo bojila u okolišu osim toga predstavljaju i estetski problem. No za okoliš je puno veći problem upravo što su ta bojila teško biorazgradiva i prije samog ispuštanja u okoliš ih je potrebno ukloniti.⁸

1.2. Sunset Yellow

1.2.1. Kemijska struktura Sunset Yellow

Sunset Yellow je umjetno narančasto bojilo iz skupine azo bojila.¹¹ Proizvodnja Sunset Yellow se dobiva isključivo sintetskim putem azo spoja.

Bojilo Sunset Yellow se dobiva umjetnim putem iz naftnih derivata. Ovaj spoj je dosta stabilan i otporan u voćnim kiselinama, svijetlu i na visokim temperaturama. U procesu proizvodnje ovog bojila nastaje karakteristična molekula s dva dušikova atoma, povezana dvostrukom vezom i koja tvore azo skupinu.



Slika 1. Kemijska struktura Sunset Yellow

Da bi se dobilo ovo bojilo, potrebno je odvijanje procesa u više stupnjeva. Ovo se bojilo kemijski sintetizira u azo spoju. Tako nastali produkt se obično dodatkom natrija

dovede u reakciju. Tako da je Sunset Yellow u pravilu natrijeva sol. U sastavu se ovo bojilo može naći pod nazivom Sunset Yellow (FCF), E 110, Gelborange S (RGL), i CI Food Yellow 3. Sunset Yellow je bojilo koje je u etanolu slabo topljivo, dok je u vodi njegova topljivost najbolja. Askorbinska kiselina (vitamin C) potpomaže kod dekoloracije ovog bojila.^{12,13,14}

1.2.2. *Sunset Yellow u namirnicama*

Sunset Yellow je bojilo koje se koristi kao aditiv u namirnicama. Ovo bojilo se smije dodavati isključivo samo u određenim namirnicama. Ono namirnicama daje žućkasto – narančasto obojenje. Količina ovog Sunset Yellow-a se za svaku namirnicu pojedinačno ograničava. Sunset Yellow se kao bojilo koristi npr. u senfu, grickalicama od žitarica ili krumpira, u topljenom siru, u pojedinim pićima, sirupima, desertima, pudingu, slatkišima, kolačima, marmeladama, voćnim pripravcima, biskvitima sa želeom od naranče, u umjetnom medu, marcipanu, itd. Marmelade koje sadrže ovo bojilo izgledaju kao da sadrže veću količinu voća u sebi, a samim time izgledaju i svježije.

Poznato je da se Sunset Yellow miješa i s ostalim bojilima, kako bi se dobile i ostale nijanse bojila. Ovo bojilo se osim u namirnicama koristi i za bojanje tekstila, u kozmetici i u lijekovima.^{14,15}

Tablica 2. Dopuštena količina Sunset Yellow u određenim namirnicama¹¹

DOPUŠTENA UPOTREBA	KOLIČINA
fini pekarski proizvodi (biskviti, kolači, vafli...), smrznuti aromatizirani deserti (sladoledi), bombonski proizvodi i slične slastice, dekoracije, ukrasi, preljevi, deserti, uključujući i aromatizirane mliječne proizvode, pripravci namijenjeni kontroli tjelesne mase, pripravci koji se upotrebljavaju pod medicinskim nadzorom	50mg/kg
bezalkoholni aromatizirani napitci	50mg/L
gorka soda, gorko vino, dodaci prehrani u tekućem obliku	100mg/L
džem, domaća marmelada, pekmez i slični voćni pripravci	100mg/kg
španjolski mesni namaz <i>Sobrasada</i>	135mg/kg
neka alkoholna pića, aromatizirana pića na bazi vina, aromatizirani vinski koktelski proizvodi	200mg/L
grickalice: ekstrudirani začinjeni proizvodi za grickanje	200mg/kg
dodatci prehrani u krutom obliku	300mg/kg
zamjena za rakove <i>Surimi</i>	500mg/kg

1.2.3. Utjecaj Sunset Yellow na ljudsko zdravlje

Iz zdravstvenih razloga se na bojilo E 110 gleda dosta kritično. To ne vrijedi samo za ovo bojilo, nego za sva bojila iz azo skupine. Od 21. srpnja 2010. god., proizvođači koji koriste Sunset Yellow, u namirnicama su primorani od strane nadležnog odbora Europske unije staviti sljedeće upozorenje na proizvod: „Može utjecati na aktivnost i pažnju kod djece.“ S tim natpisom postaje jasno kako i na koji način procijeniti ovu skupinu tvari. Prije 2009. god. je maksimalna dopuštena dnevna doza Sunset yellow-a iznosila 2,5 mg/kg tjelesne mase, dok danas granice teže prema 1mg/kg tjelesne mase. Kod osoba koje su sklone preosjetljivosti i alergijama, ovo bojilo može izazvati kožne alergijske reakcije, kao što su osip i ekcemi koji povrh toga uzrokuju poteškoće u disanju. Osobe alergične na salicilnu i benzojevu kiselinu ili osobe koje boluju od astme, također mogu osjetljivo reagirati pri konzumiranju Sunset Yellow. Kombinacija benzojeve kiseline i Sunset Yellow, može izazvati sindrom hiperaktivnosti kod djece. Ovo bojilo može sadržavati i aluminij, za kojeg se sumnja da može uzrokovati Alzheimer-ovu i Parkinson-ovu bolest. Istraživanje na stanicama miševa pokazalo je kako bojilo Sunset Yellow ima genotoksični učinak na stanice, a koji se manifestirao u povećanoj frekvenciji razmjene sestrinskih kromatida u stanicama koštane srži, pojavi kromosomskih aberacija somatskih i zametnih stanica, povećanju morfološke abnormalnosti spermija i pojavi fragmentacije DNA. Sunset Yellow može izazvati razne nuspojave, kao što su rinitis, utikarije, alergije, bolove u trbuhu, probavne smetnje, mučnine i povraćanja. Ovo umjetno bojilo može izazvati još puno gorih nuspojava, kao npr. tumor bubrega, kromosomska oštećenja i povećane učestalosti tumora kod životinja. U Norveškoj i Švedskoj je zabranjeno koristiti ovo bojilo.^{6,11,13,14,15}

1.3. Metode određivanja

1.3.1. Spektroskopija

Izraz *spektroskopija* s povijesnog se gledišta odnosio na granu znanosti koja se bavila svjetlošću (tj. vidljivim zračenjem) razlučenome u komponente, valne duljine, koje tvore *spektar*. Proučavanjem svjetlosti, kao i drugih elektromagnetskih zračenja, poput: X-zraka, ultraljubičastog, infracrvenog, mikrovalnog i radiofrekvencijskog zračenja, pojam spektroskopije se znatno proširio. Pojam spektroskopskih metoda je danas proširen i na tehnike kao što su masena, elektronska i akustička spektroskopija.

Proces u kojem određena kemijska vrsta, prisutna u propusnoj sredini, smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja, naziva se *apsorpcija*. Elektromagnetsko zračenje je vrsta energije koja ogromnom brzinom prolazi prostorom. Svaka elementarna čestica, prema kvantnoj teoriji, ima jedinstven raspored energijskih stanja, gdje je *osnovno* stanje, najniže stanje. Do apsorpcije fotona dolazi isključivo ako je energija fotona jednaka energijskoj razlici osnovnog i nekog od viših energijskih stanja čestice. Na taj način dolazi do prelaska energije fotona u atom, molekulu ili ion, dovodeći je u više energijsko pobuđeno stanje. Pobuđena se vrsta relaksira nakon kratkog vremena, do svoga osnovnog ili prethodnog stanja. Za vrijeme relaksacije, pobuđena vrsta višak svoje energije predaje drugim atomima ili molekulama u istoj okolini. Međutim, količina te otpuštene energije za vrijeme relaksiranja, je najčešće toliko mala da se ne može ni detektirati.

Optičkim instrumentima se nazivaju osnovni dijelovi analitičkih instrumenata za emisijsku, apsorpcijsku i fluorescencijsku spektroskopiju, koji su međusobno vrlo slični.

Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena od pet osnovnih dijelova:

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

Kod apsorpcijskih mjerenja, snop koji dolazi iz izvora prolazi uzorkom tek nakon izlaza iz selektora valnih duljina, dok kod određenih instrumenata imamo obrnute položaje

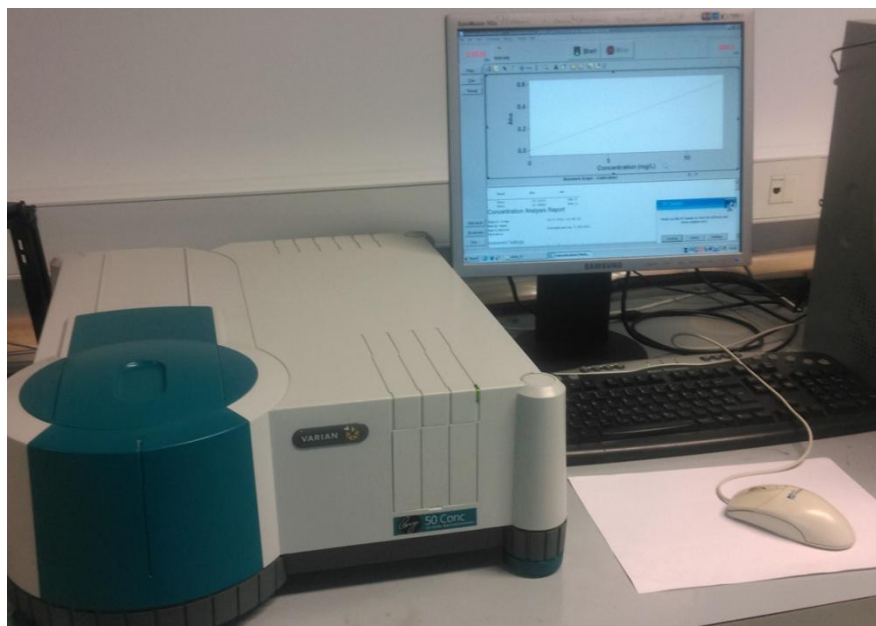
selektora i spremnika. Za jednostavnu detekciju se koriste vanjski izvori konstantnog i dovoljno snažnog zračenja, što zapravo zahtijevaju *apsorpcijska i fluorescencijska spektroskopija*.

Spremnici za uzorke, često nazivani *ćelijama* ili *kivetama*, moraju imati prozore načinjene od materijala prozirnoga u određenom spektralnom području. Silikatno staklo se najčešće primjenjuje u području od 375 – 2000 nm, dok se kvarc upotrebljava za rad u ultraljubičastom području (ispod 350 nm). Kvarc se može primijeniti u infracrvenom području i do 3000 nm. Za prozore u infracrvenom području se najčešće koriste kristalični natrijev klorid. Prozori kiveta bi trebali biti okomiti na smjer snopa, iz razloga što se na taj način smanjuju gubitci zbog refleksije. Debljina ćelija koja se najčešće primjenjuje za ultraljubičasto i vidljivo područje, iznosi 1 cm.

Razlikujemo nekoliko tipova spektroskopskih instrumenata, a to su :

- Spektroskop – sadrži modificirani monokromator u kojem je žarišna ravnina s izlaznom pukotinom zamijenjena pokretnom lećom koja omogućuje vizualnu detekciju emisijskih linija, te se koristi za određivanje elemenata u uzorku koji je ekscitiran u plamenu.
- Kolorimetar – je uređaj za apsorpcijska mjerenja, koji kao detektor koristi ljudsko oko.
- Fotometar – je uređaj koji se koristi za emisijska, apsorpcijska i fluorescencijska mjerenja s vidljivim, ultraljubičastim i infracrvenim zračenjem.
- Spektrograf – se prije svega primjenjuje za kvalitativnu analizu elemenata i snima spektre na fotografsku ploču ili na film smješten uzduž žarišne ravnine monokromatora.
- Spektrometar – predstavlja monokromator s pukotinom učvršćenom u žarišnoj ravnini.
- Spektrofotometar - je spektrometar s fotopretvornikom.

Moguće je koristiti ove instrumente za određivanje emisijskih, apsorpcijskih i fluorescencijskih mjerenja.¹⁶



Slika 2. Spektrofotometar Varian Cary

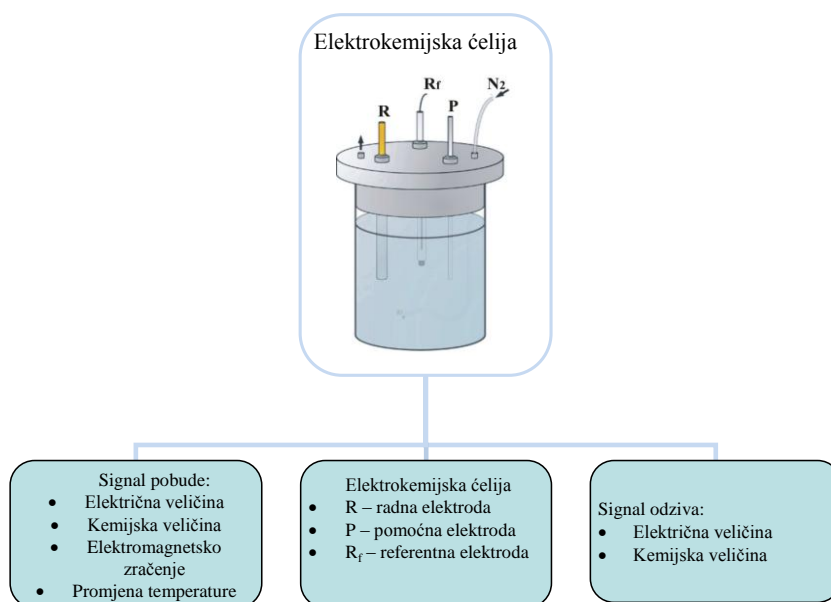
1.3.2. Voltometrija

Skupina elektroanalitičkih postupaka u kojima je električni napon struja i ona predstavlja signal pobude, naziva se *voltometrija*. Ovisno o funkciji narinutog napona, dobiva se signal odziva članka. Dobivena ovisnost se može prikazati grafički i naziva se voltamogram.

Voltometrijske metode koje se najčešće primjenjuju su: ciklička, pravokutnovalna, „stripping“ i diferencijalna pulsna voltometrija. Ove metode se koriste za kvantitativnu analizu organskih i anorganskih tvari u vodenim i ne vodenim medijima, za istraživanje kinetike, za određivanje redoks potencijala, itd.

Instrument korišten u voltometriji se sastoji od tri dijela, a to su : računalo, potenciostat (mjeri jakost struje uz narinuti potencijal) i elektrokemijski članak (Slika 3.), u kojem se nalazi otopina analita, u koju su uronjene tri elektrode, radna, protu elektroda i referentna elektroda. Između radne i protu elektrode se mjeri struja, dok se između radne i referentne elektrode mjeri potencijal. Radna elektroda mora biti male površine, kako bi se pospješila polarizacija, te se razgradnja analita elektrolizom smanjuje.

Za oksidacijske procese se koriste krute elektrode, kao npr. grafitne, staklaste ugljične, platinske elektrode, itd. Osjetljivost i reproducibilnost mjerenja, ovise o izboru elektroda.¹⁷



Slika 3. Elektrokemijska ćelija ¹⁸

1.3.2.1. Ciklička voltometrija

Ciklička voltometrija (*engl. cyclic voltammetry, CV*) služi za određivanje redoks potencijala, broja izmijenjenih elektrona, istraživanja adsorpcijskih procesa, kemijskih reakcija, te za istraživanje kinetike i mehanizma redoks reakcija.

Pomoću ove metode moguće je pratiti spore i brze elektrodne reakcije, zbog korištenja različitih brzina određenog potencijala. Na radnoj elektrodi dolazi do linearnog mijenjanja potencijala s vremenom, dok se smjer promjene potencijala mijenja u trenutku kada dosegne određenu vrijednost. Dobiveni signal pobude, linearnog mijenjanja potencijala s vremenom, izgleda u obliku trokuta. Upravo se zbog kontinuirane linearne promjene potencijala, na elektrodi događa elektrokemijska reakcija, koja se očituje kao struja. Približavanjem potencijala, redoks potencijalu analita, potrebno je konstantno mjeriti struju koja protječe kroz članak, jer dolazi do promjene struje, odnosno do porasta jakosti struje.

Međutim, nakon pojave strujnog vala, koncentracija analita u blizini elektrode se smanjuje i dolazi do pada jakosti struje. Strujni val nastaje promjenom potencijala preko karakterističnog potencijala redoks procesa. Produkti nastali u prvoj polovici ciklusa, će se reducirati ili oksidirati kada se potencijal vrati na početne vrijednosti. Ciklički voltamogram, koji predstavlja rezultirajuću odzivnu krivulju, poprima oblik ovisno o

brzinama prijenosa elektrona, prijenosa tvari i kemijskim reakcijama, kao što je prikazano na slici 5.^{17,18}

Na samom početku promjene potencijala, odvija se polariziranje elektrode, što znači da se elektrodna reakcija ne odvija, odnosno voltamogram pokazuje ravan tok krivulje. Elektrokemijska reakcija, određene vrste u otopini, će se odvijati uslijed većeg pomaka potencijala, što znači kada se elektroda dovoljno polarizira i samim time dolazi do porasta struje. Nakon toga dolazi do formiranja anodnog strujnog vrha, koji je definiran strujom anodnog vrha, j_{pa} . Uslijed smanjenja koncentracije elektroaktivne vrste u difuznom sloju dolazi do opadanja brzine difuzije. Vraćanjem potencijala od $E_2 - E_1$, formira se katodni strujni vrh, koji je definiran strujom katodnog vrha, j_{pk} .

Ovo je opisano Randles – Ševčik- ovom jednadžbom:

$$j_p = 2,69 \times 10^5 z^{3/2} c_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (1),$$

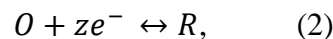
gdje je: j_p - maksimum gustoće struje, $A m^{-2}$,

c - koncentracija elektroaktivnih specija, $mol m^{-3}$,

D - difuzijski koeficijent, $m^2 s^{-1}$

V - brzina promjene potencijala, $V s^{-1}$.

Reverzibilna elektrokemijska reakcija redukcije koja se odvija, glasi:



Gdje „O“ predstavlja oksidirajući oblik redoks sustava, a „R“ reducirajući.

Parametri bitni za razumijevanje voltamograma su: potencijali katodnog i anodnog voltometrijskog odziva ili vrha vala (E_{pk}) (E_{pa}) i visine katodnih i anodnih voltometrijskih struja (j_{pk} i j_{pa}), (slika 4). Iz ove razlike potencijala vrhova, može se odrediti broj izmijenjenih elektrona prema jednadžbi:

$$\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 2,303 \frac{RT}{nF} \quad (3)$$

gdje je ΔE_p – razlika između potencijala katodnog vrha vala i anodnog vrha vala;

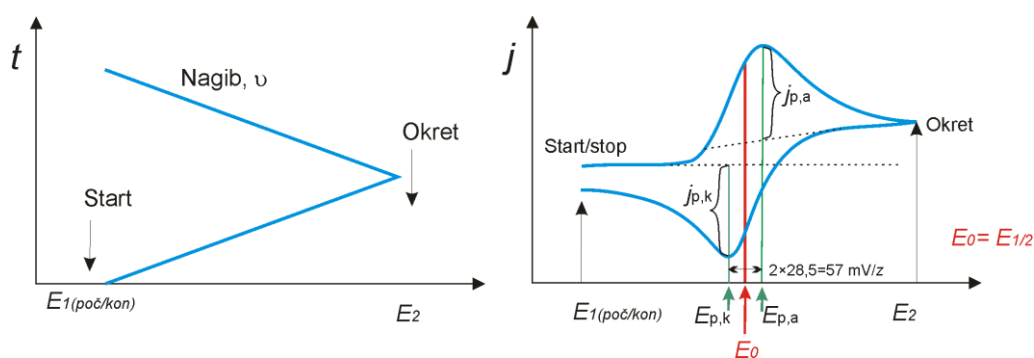
R– opća plinska konstanta, $8,314472 J K^{-1} mol^{-1}$;

T– apsolutna temperatura; n– broj izmijenjenih elektrona;

F– Faraday-eva konstanta, $F = 9,64853399 \times 10^4 C mol^{-1}$, pri $25^\circ C$

Da bi se omogućilo odvijanje elektrokemijske reakcije, potrebno je na elektrodu površinu dovesti reaktante i odvesti produkte.

Uz samu elektrodu se nalazi tanki sloj koji se naziva *difuzijski granični sloj*. U tom sloju se odvija difuzijski prijenos mase, zbog postojanja koncentracijskog gradijenta, u smjeru od mase otopine prema elektrodi, zbog mogućnosti otapanja metala i u smjeru od elektrode prema masi otopine. Praćenjem događanja promjenom potencijala, prekidanjem promjene potencijala pri određenom potencijalu i međusobnim uspoređivanjem različitih ciklusa, dobije se uvid u ispitivani sustav.



Slika 4. Reverzibilni ciklički voltamogram redoks para. Prikaz pobude (lijevo) i odziv (desno) elektrokemijskog sustava.¹⁸

1.3.2.2. Pravokutnovalna voltometrija (Square wave)

Pravokutnovalna voltometrija, koju su preložili Ramaley i Krause, a razvili Osteryoung i suradnici, dobila je naziv upravo na osnovu signala voltametrije, s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude koji je stubasto rastući odnosno padajući.

Prednost ove metode je njezina brzina i to što voltamogram može biti snimljen za nekoliko sekundi. S obzirom na brzinu ove metode, u novije vrijeme se koristi u kvantifikaciji i detekciji ionskih i molekulskih vrsta. Razlog tome je da frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu iznimno brzih promjena potencijala, čime je skraćeno vrijeme analize. Za vrijeme svakog ciklusa, struju je potrebno mjeriti dva puta i to na početku polaznog pulsa i na kraju pulsa suprotnog smjera. Ovu tehniku je moguće koristiti za istraživanje mehanizma prijenosa elektrona, iz razloga što je veličina pulsa za reverzibilnu reakciju redukcije dovoljna da se oksidacija produkta, koji se stvorio na polaznom pulsu, dogodi za vrijeme pulsa suprotnog smjera. Anodnu struju proizvodi povratni puls, dok katodnu proizvodi polazni puls i razlika ovih dviju struja razmjerna je koncentraciji analita u otopini. Upravo razlika ovih dviju struja predstavlja ukupnu struju, $\Delta I_p = I_F - I_B$, koja se očitava u amperima „A“ (slika 6. (desno)). Da bi se

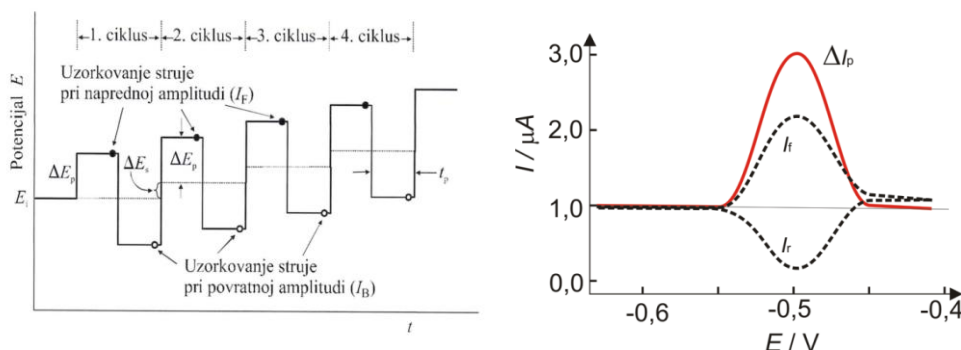
potvrdio identitet analita, koristi se potencijal maksimuma. Promatrajući ovu reverzibilnu reakciju:



gdje je na odabranom, znatno pozitivnijem potencijalu od formalnog redoks potencijala E_0 , na početku reakcije u otopini, prisutna samo oksidirajuća vrsta „O“. Na slici 6 (lijevo) je prikazan signal pobude koji predstavlja razliku poluperiode izmjeničnog signala, koji sadrži samo komponentu struje koja se odnosi na oksidaciju ili redukciju elektroaktivne vrste. Ovaj signal je određen amplitudom pravokutnog naponskog impulsa (ΔE_p) u odnosu na trajanje naponskog impulsa (širinu stube, t_p) i potencijal pomaka (ΔE_s). Trajanje naponskog impulsa se definira frekvencijom impulsa: $f = 1/2 t_p^{-1}$. Pri odabranom potencijalu E_1 , signal pobude, promjenom potencijala počinje stubasto rasti brzinom promjene potencijala.

$$v = \Delta E_s / 2t_p \subset f \Delta E_s \quad (5)$$

Ova metoda je poprilično precizna i točna i moguće ju je koristiti za analizu niza realnih uzoraka.



Slika 5. Oblik naponskog signala pravokutnovalnoj voltametriji: prikaz pobude (lijevo) i odziva (desno) elektrokemijskog sustava^{17,18}

1.3.3. Staklasti ugljik (Glassy carbon)

Staklasti ugljik (Glassy carbon, GC), je prvi put laboratorijski dobiven iz celuloze, 60-ih godina prošlog stoljeća u laboratoriju *The General Electric Company, UK*.

Naime, radi se o materijalu koji kombinira osobine stakla i keramike s osobinama grafita i upravo zbog takvih osobina je pronašao svoje mjesto u mnogim granama industrije. Staklasti ugljik se često upotrebljava u elektrokemiji, iz razloga što posjeduje

otpornost na visoke temperature, kemikalije i uz to je nepropusan za plinove i tekućine. GC je relativno reproducibilan i kompatibilan sa svim poznatim otapalima, te je rezistentan na koroziju kiselinama.

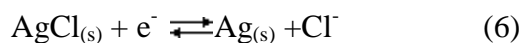
Struktura staklastog ugljika je u potpunosti sp^2 hibridizacija ugljika.^{17,18}

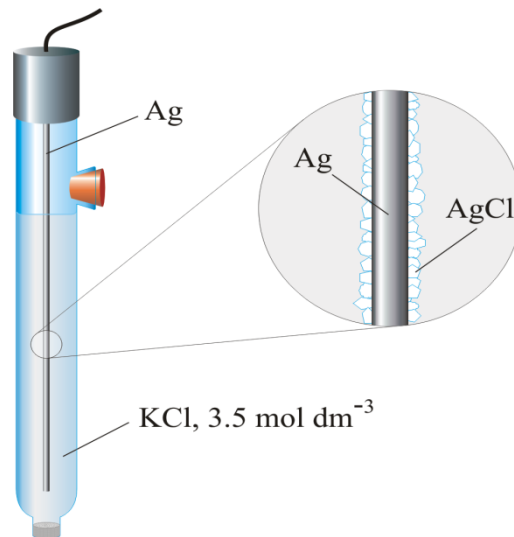


Slika 6. Struktura i materijali dobiveni iz staklastog ugljika.¹⁸

1.3.4. Referentna elektroda

Referentna elektroda ima poznati potencijal koji je u potpunosti neovisan o koncentraciji elektroaktivne vrste. Elektroda da bi bila idealna, treba imati stalan i poznat potencijal ($E=0,199$ V, pri 25°C) koji je neovisan o sastavu otopine. Ne smije doći do promjene potencijala pri prolazu malih struja i izvedbe trebaju biti jednostavne. U izvedbi ovoga diplomskog rada je korištena referentna srebro/srebrov klorid (Ag/AgCl) elektroda, koja je zbog svoje stabilnosti, cijene i jednostavnosti, jedna od najčešće primjenjivanih referentnih elektroda. Reakcija koja se odvija u polučlanku je¹⁹:





Slika 7. Referentna Ag/AgCl elektroda¹⁹

1.3.5. Protuelektroda

Pri ovom mjerenju se kao protuelektroda koristila elektroda od platinskog lima, kojoj je površina 1 cm². U elektrokemijskom članku, ova je elektroda smještena nasuprot radnoj elektrodi da bi se dobilo simetrično električno polje.¹⁸

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Kemijske analize

Kemikalije

Pri izradi ovoga rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Pripravljeni standard Sunset Yellow $\gamma=0,15$ g/L
- Ultračista voda
- Limunska kiselina, 20%-tna ($C_6H_8O_7$), $M=192,124$ g/mol
- Octena kiselina (CH_3COOH), puris, 99–100%, $M = 58,44$ g mol⁻¹ Kemika d. d., Zagreb
- Dušična kiselina (HNO_3), p.a., min. 65%, $M = 63,01$ g mol⁻¹ Kemika d. d., Zagreb
- Otopina kalijeva nitrata (KNO_3), 0,5 M, $M=101,1032$ g/mol

2.1.Priprava otopina

2.1.1. Priprava otopine standarda Sunset Yellow

Pri pripravi otopine standarda Sunset Yellow, potrebno je izvagati 0,1507g i zatim otopiti u 1L ultračiste vode.

2.1.2. Priprava otopine limunske kiseline

Priprava 0,1 mol/L, 20%-tne otopine limunske kiseline vrši se na način da se razrijedi 88,93 mL otopine $C_6H_8O_7 \times H_2O$ do točnog volumena ultračistom vodom.

2.1.3. Priprava natrijeva acetata

Pri pripravi natrijeva acetata, koncentracije 0,1 mol/L, potrebno je izvagati 8,2034 g NaAc, te zatim otopiti u ultračistoj vodi i nadopuniti do 1 L.

2.1.4. Priprava octene kiseline

Otopina octene kiseline, koncentracije 0,1 mol/L, pripravlja se razrjeđivanjem 99%-tne HAc do 1L ultračistom vodom.

2.1.5. Priprava otopine kalijeva nitrata

Otopina kalijeva nitrata se priprema na način da se odvaži 20,22 g kalijeva nitrata, koncentracije 0,5 mol/L, koja se potom otopi u 2L ultračiste vode.

2.1.6. Priprava acetatnog pufera

Otopina pufera je pripravljena miješanjem 0,1 mol/L otopine octene kiseline i 0,1 mol/L otopine natrijeva acetata, odgovarajućih volumena, do željene pH vrijednosti (pH=4,5)

2.2. Spektrofotometrijska metoda

2.2.1. Metodika

Iz izvorne standardne otopine Sunset Yellow, pripreme se 4 standardne otopine. Ove 4 standardne otopine je potrebno pripremiti da bi se prilikom spektrofotometrijskog mjerenja dobila *scan* krivulja i krivulja umjeravanja. *Scan* je potreban zbog određivanja valne duljine na kojoj je maksimalna apsorbancija za ispitivano umjetno bojilo Sunset yellow. *Scan* slijepe probe se radi prije *scan*-a standardnih otopina. Kao slijepa proba se koristila ultračista voda. Literaturno je pronađeno da pri pH=7, valna duljina iznosi 485 nm. Standardi su pripremljeni na način da se 0,5; 2,5; 5 i 7,5 mL izvorne otopine standarda, umjetnog bojila (Sunset Yellow), otopi u ultračistoj vodi, u tikvici od 100 mL i nadopuni do oznake.

Nakon dobivenog *scan*-a i pripreme standardnih otopina, potrebno je izračunati koncentracije pripremljenih standardnih otopina, kako bi se mogao dobiti krivulja umjeravanja. Potrebne koncentracije se dobiju iz proračuna:

$$Y_{\text{standardne otopine}} = \frac{V_{\text{izvornog standarda}} \times Y_{\text{izvornog standarda}}}{V_{\text{uzorka}}} \quad (7)$$

Nakon izračunatih koncentracija, podatci se unose u računalo i započinje se s mjerenjem. Pri završetku mjerenja se dobije krivulja umjeravanja, koja nam služi za određivanje nepoznatih koncentracija realnih uzoraka.

2.2.2. Postupak pripreme uzoraka

Za pripravu krutih uzoraka se odvagalo se približno 2 g uzorka, dok se priprava tekućih uzoraka vršila pipetiranjem 25 mL uzorka i razrjeđivanjem s ultračistom vodom do 100 mL. Rezultati za krute uzorke koji su određivani spektrofotometrijski dati su u mg/L, međutim vodeći se literaturnim podacima, pretvarali smo ih u mg/kg.

- Tableta Strepsils – tableta se smrvi u tarioniku i potom se izvaže 2,0040 g te otopi u ultračistoj vodi, u tikvici od 100 mL koja se nadopuni do oznake.
- Haribo bombon (naranča) – Izvaže se oko 2 g bombona. Nakon toga se bombon otopi u ultračistoj vodi, uz zagrijavanje (zbog prisustva želatine). Kada se bombon u potpunosti otopi, cijeli sadržaj se prebaci u tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake.
- Haribo bombon (limun) – izvaže se oko 2 g bombona. Nakon toga se bombon otopi u ultračistoj vodi, uz zagrijavanje (zbog prisutnosti želatine). Kada se bombon u potpunosti otopi, cijeli sadržaj se prebaci u tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake.
- Cedevita (naranča) – izvaže se oko 2 g cedevite i otopi se u ultračistoj vodi, nakon čega se ukupni sadržaj prebaci u tikvicu od 100 mL i nadopuni se do oznake.
- Sok od naranče (TO) i energetska napitak (Isotonic) - otopi se 25 mL uzorka u 100 ml ultračiste vode.
- Fanta – uzorak se najprije zagrijava, kako bi se otpustio ugljikov (IV) oksid (CO₂). Nakon što se sav CO₂ otpusti, otpipetira se 25 mL uzorka, otopi u ultračistoj vodi i nadopuni do oznake u tikvici od 100 mL.

Uzorci se nakon pripreve centrifugiraju, zbog prisutnih suspendiranih čestica.

Potreban pribor i aparatura:

- Tikvice od 100 mL
- Pipete od 25 ml, mikropipete od 1 i 5 ml, pipetman, Gilson
- pH- metar i kombinirana elektroda
- Analitička vaga, Mettler, AT261, (točnost 1×10^{-4} g),
- Magnetska miješalica, MSH-20A
- Centrifuga, Centric 322A, na 4300 okr/min

2.3. Voltametrijske metode

2.3.1. Metodika

Kod voltametrijskih metoda otopina je pripravljena na sljedeći način. Uzeto je 1 ml standardne otopine Sunset Yellow, koncentracije 0,1507 g/L i otopljeno u 100 mL otopine KNO₃. Iz toga slijedi da koncentracija otopine iznosi $1,507 \times 10^{-3}$ g/L.

Korištene su dvije voltametrijske metode, a to su ciklička i pravokutnovalna voltametrija (square wave). Nakon što je određen elektrolit u kojem će se vršiti mjerenja, na osnovu kriterija niže osnovne struje, određeno je i područje potencijala u kojem će se vršiti mjerenja. Ovom metodom su dobivene osnovne elektrokemijske informacije o ispitivanom sustavu, u području između potencijala razvijanja vodika i kisika.

Pomoću katodne i anodne voltametrije, sa pravokutnovalnom voltametrijom je provedena elektroanalitička primjena elektrode od staklastog ugljika.

2.3.2. Postupak pripreme elektroda (elektroda od staklastog ugljika)

Radna elektroda je staklasti ugljik (GCE), koji ima promjer od 6 mm i površinu valjka od 0,283 cm². Baza valjka je u direktnom kontaktu s elektrolitom, dok je ostatak izoliran teflonom.

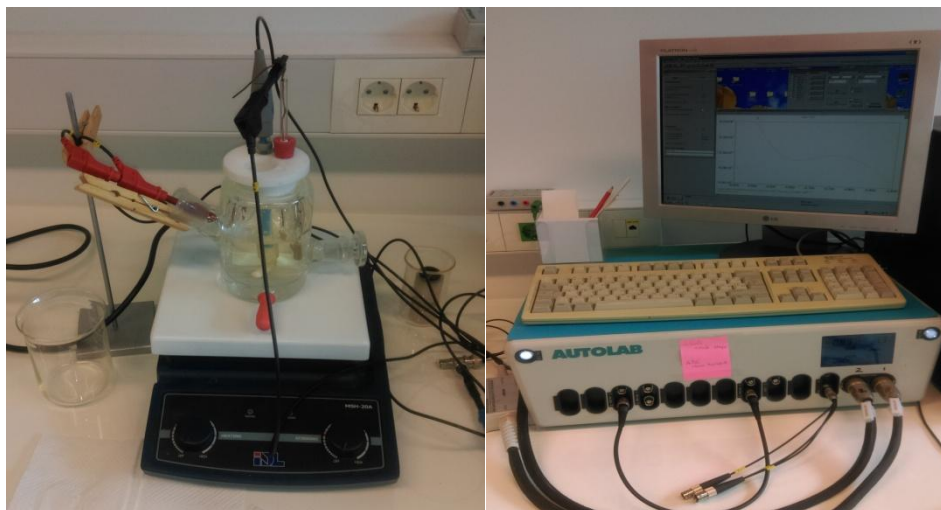
Mehanički – obrušena elektroda od staklastog ugljika se polira pomoću brusnih pasti, finoće 1 i 0,05 mikrona (Buhler Micropolish Alpha Alumina). Nakon pravilnog brušenja i poliranja elektrode, slijedi ispiranje destiliranom vodom i završno uklanjanje sitnih, nevidljivih čestica, u ultrazvučnoj kupelji.

Kemijski – elektroda se kemijskim metodama čisti pomoću destilirane vode, etilnog alkohola i redestilirane vode te se na kraju suši u struji dušika, 5 minuta.

Elektrokemijski – na kraju pripreme slijedi elektrokemijsko čišćenje koje se provodi aktiviranjem površine elektrode koja je podvrgnuta ciklizaciji u području potencijala od -1,0 mV do 1,0 mV u dušičnoj kiselini (0,5 M), uz predobradu od 60 s na potencijalu -1,2 mV, a potom na 1,5 mV 60 s, da bi se uklonile nečistoće.

2.3.3. Priprema ćelije za elektrokemijsko mjerenje

Za elektrokemijska mjerenja korištena je ćelija volumena 100 mL, koju je bilo potrebno najprije dobro isprati vodovodnom vodom, potom destiliranom vodom i na kraju 0,5 M dušičnom kiselinom i redestiliranom vodom. Nakon pripreme elektrokemijske ćelije, bilo ju je potrebno pravilno postaviti. U ćeliju (*Slika 8*, lijevo) se ulije 100 mL određenog elektrolita (otopina KNO_3), zatim se postave pravilno elektrode (radna, referentna Ag/AgCl i protuelektroda), ubaci se miješalo, spoji se na strujni krug i upale se računalo i ćelija (*Slika 8*, desno)



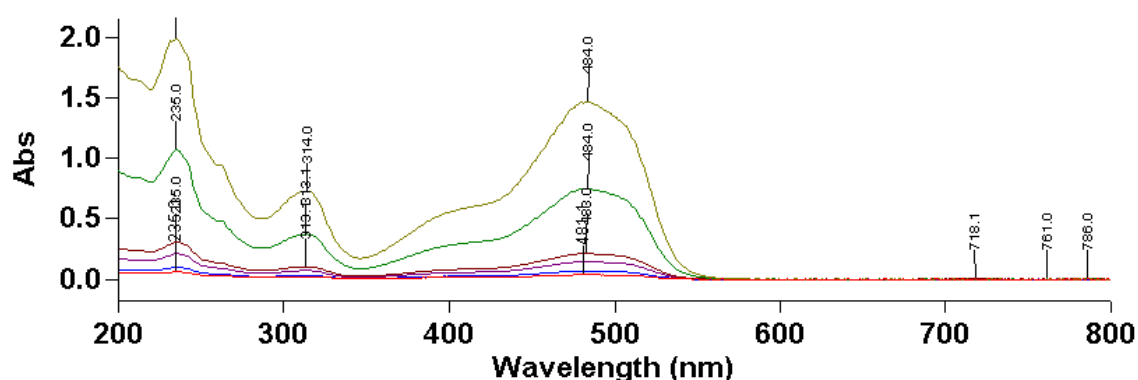
Slika 8. Prikaz pripremljene elektrokemijske ćelije (lijevo) priključene na računalo na kojem se dobivaju podatci o elektrokemijskim mjerenjima (desno).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Spektrofotometrijska metoda određivanja Sunset Yellow-a

3.1.1. Scan Sunset yellow-a pri pH=7

Prikazan je scan za sve pripravljene standarde u području valne duljine od 200 – 800 nm. Prema literaturnim podatcima, valna duljina pri kojoj se javlja pik, iznosi 485 nm na pH=7.

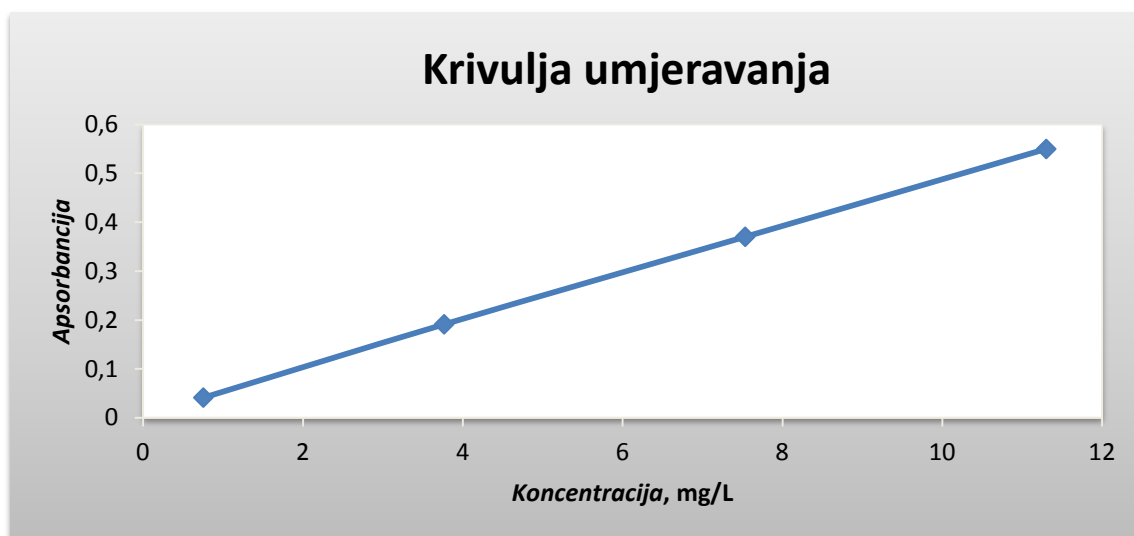


Slika 9. Prikaz *scan-a* u području valne duljine od 200-800 nm

Iz rezultata je vidljivo da se pik javlja na valnoj duljini od 484 nm, što se poklapa s literaturnim podatcima. Nakon dobivenog *scan-a*, pripravljene su standardi od 0,5; 2,5; 5 i 7,5 mL, te su podvrgnuti spektrofotometrijskom mjerenju s ciljem dobivanja krivulje umjeravanja.

Tablica 3. Koncentracije standardnih otopina sunset yellow-a za krivulju umjeravanja

Standard otopina	Bojilo, mL	H ₂ O, mL	Uzorak, mL	Masena koncentracija bojila, mg/L	Masena koncentracija standarda, mg/L	Apsorbancija
1.	0,5	99,5	100	150,7	0,7535	0,0413
2.	2,5	97,5	100	150,7	3,7675	0,1912
3.	5,0	95,0	100	150,7	7,535	0,3701
4.	7,5	92,5	100	150,7	11,3025	0,5497

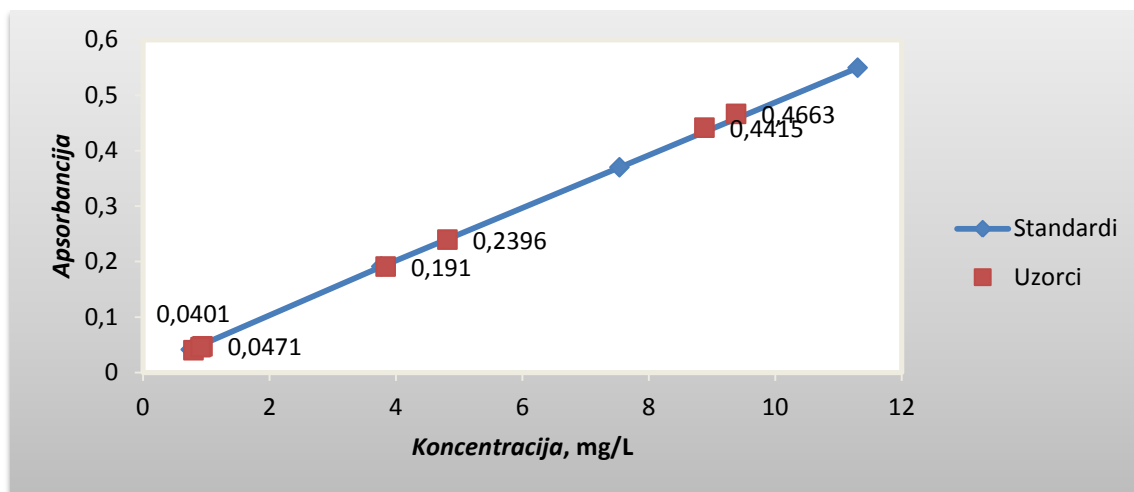


Slika 10. Krivulja umjeravanja

Nakon dobivene krivulje umjeravanja, pripremljeni su realni uzorci, na način opisan u eksperimentalnom dijelu.

Tablica 4. Koncentracije ispitivanih uzoraka dobivenih spektrofotometrijskom analizom

Uzorci	Masena Koncentracija, mg/L	Apsorbancija
<i>Haribo (žuti)</i>	0,7964	0,0401
<i>Haribo (narančasti)</i>	0,939	0,0471
<i>Strepsils</i>	0,9089	0,0456
<i>Sok TO</i>	8,8791	0,4415
<i>Fanta</i>	3,8366	0,191
<i>Cedevita</i>	4,8139	0,2396
<i>Isotonic</i>	9,3794	0,4663

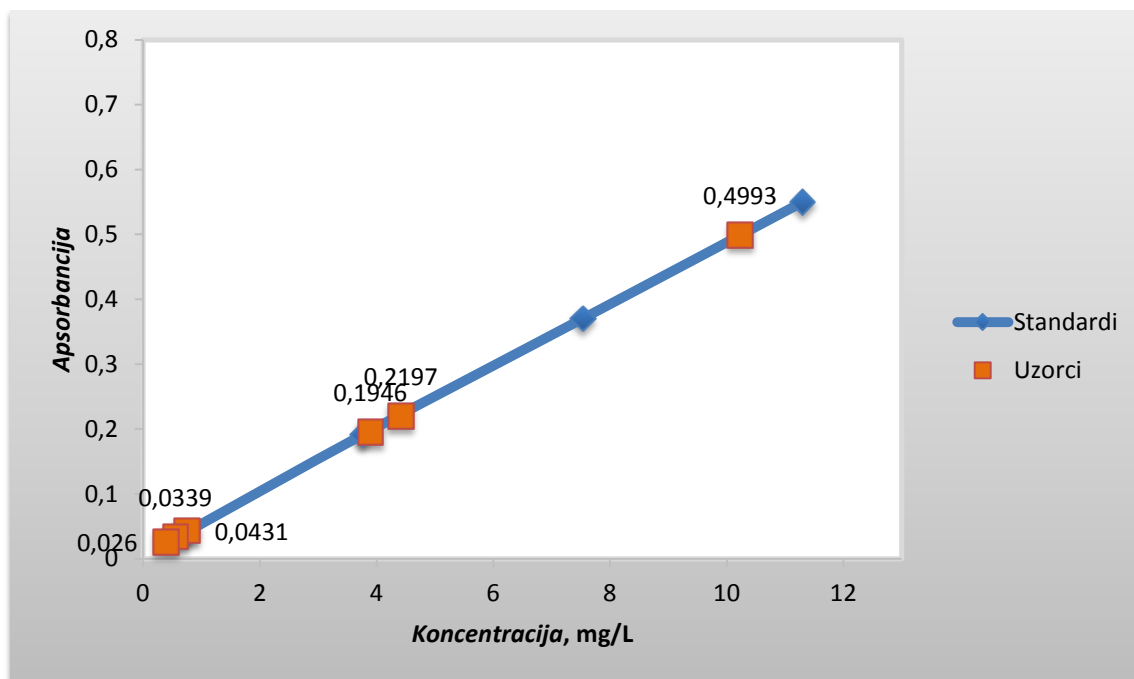


Slika 11. Krivulja umjeravanja za realne uzorke

Iz *Tablice 5* i *Slike 11*, je vidljivo da se koncentracije realnih uzoraka poklapaju s koncentracijama pripremljenih standarda. Međutim sat vremena nakon prvog mjerenja, ponovljeno je mjerenje s istim uzorcima i dobiveni su slijedeći rezultati.

Tablica 5. Rezultati dobiveni nakon ponovljenog mjerenja

Uzorci	Masena Koncentracija, mg/L	Apsorbancija
<i>Haribo (žuti)</i>	0,7469	0,0431
<i>Haribo (narančasti)</i>	0,5552	0,0339
<i>Strepsils</i>	0,3914	0,026
<i>Sok TO</i>	15,9091	0,7723
<i>Fanta</i>	3,8963	0,1946
<i>Cedevita</i>	4,4181	0,2197
<i>Isotonic</i>	10,2327	0,4993

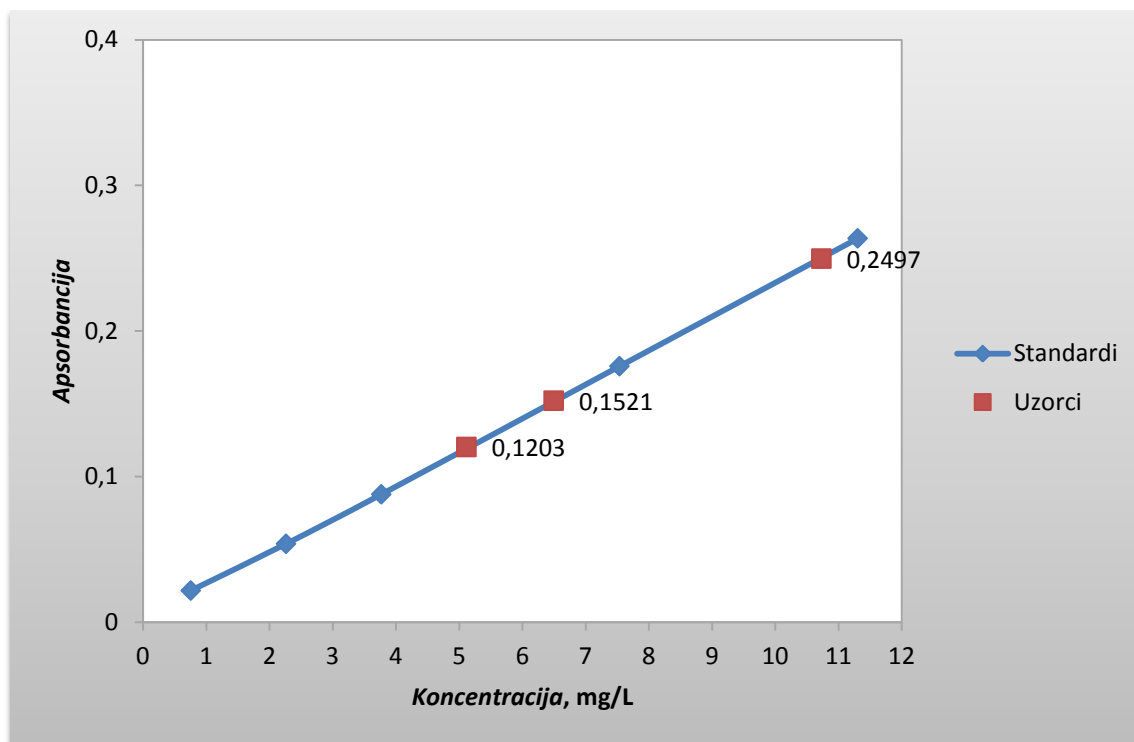


Slika 12. Krivulja umjeravanja za realne uzorke nakon sat vremena

Na osnovu priloženih rezultata i usporedbom prvog i drugog mjerenja istih uzoraka, može se zaključiti da je došlo do promjene u koncentraciji, što navodi na to, da se u određenim uzorcima ne radi o analiziranom bojilu. Da bismo bili sigurni u pretpostavke, mjerenje je ponovljeno na valnoj duljini od 313 nm, iz razloga što se pri toj valnoj duljini pojavio manji pik. Ovo mjerenje je napravljeno da bi bili sigurni radi li se o analiziranom bojilu. Dobiveni rezultati su prikazani u *Tablici 6*.

Tablica 6. Koncentracije standardnih otopina Sunset Yellow-a za krivulju umjeravanja pri $\lambda=313$ nm

Standardna otopina	Bojilo, mL	H ₂ O, mL	Uzorak, mL	Masena koncentracija bojila, mg/L	Masena koncentracija standarda, mg/L	Apsorbancija
1.	0,5	150,2	100	150,7	0,7535	0,0217
2.	1,5	149,2	100	150,7	2,2605	0,0538
3.	2,5	148,2	100	150,7	3,7675	0,0878
4.	5	145,7	100	150,7	7,535	0,1758
5.	7,5	143,2	100	150,7	11,3025	0,2636

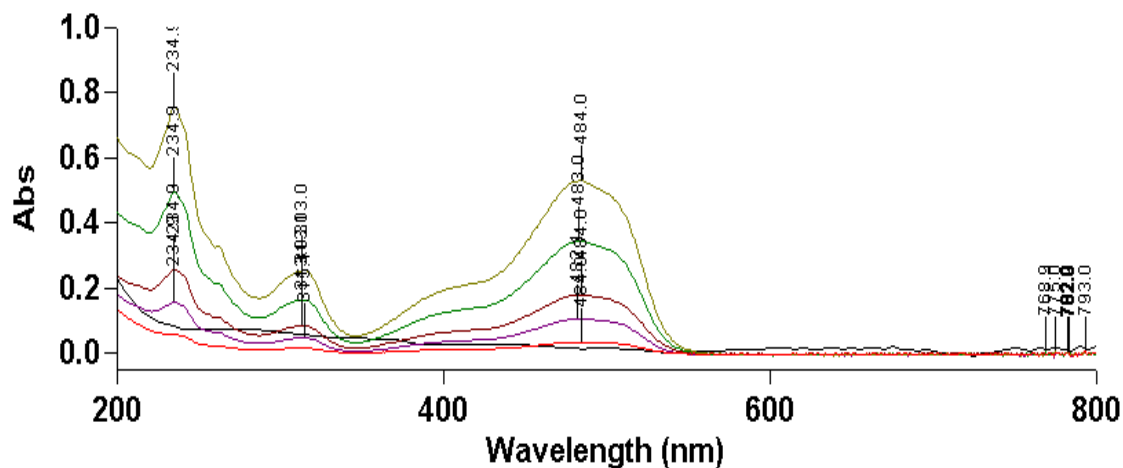


Slika 13. Krivulja umjeravanja pri valnoj duljini od 313nm.

Usporedbom koncentracija na valnoj duljini od 484 nm i na valnoj duljini od 313 nm, zaključujemo, da pojava pika na valnoj duljini od 313 nm ne predstavlja analizirani Sunset Yellow. Upravo usporedbom koncentracija zaključujemo da je na valnoj duljini 313 nm, došlo do reakcije druge vrste u otopini.

3.1.2. Scan Sunset Yellow-a pri $pH \approx 4$

Prema literaturnim podacima, umjetno bojilo je osim u vodi, topljivo i u kiselom mediju, pri $pH=4,5$. Nakon spektrofotometrijskih određivanja Sunset Yellow-a pri različitim valnim duljinama, u vodi, mjerenja su se vršila i pri $pH=4,5$ zbog usporedbe rezultata. pH je bilo nužno spustiti na $pH \approx 4$. Najprije se spuštalo s 20%-tnom limunskom kiselinom. Međutim, kiselina je previše snižavala pH , pa je bilo potrebno 20%-tnu limunsku kiselinu razrijediti na 5%-tnu, koja nam je snizila pH na željenu vrijednost. Kako smo promijenili pH područje, bilo je potrebno ponovno napraviti *scan*, u kiselom mediju i nakon toga na isti način, kao gore opisano, pripremiti standarde i uzorke. Nakon završenog mjerenja, dobiveni su sljedeći rezultati:



Slika 14. Prikaz *scan-a* u limunskoj kiselini

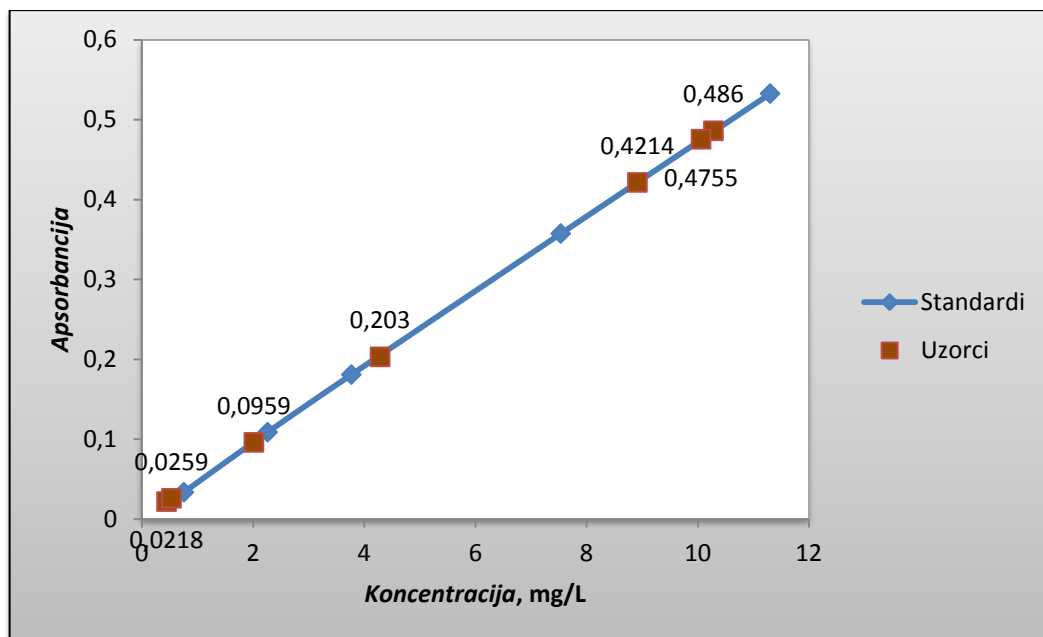
Iz dobivenog *scan-a* je vidljivo da se pik pojavljuje pri valnoj duljini od 484 nm. Pri toj valnoj duljini su vršena daljnja mjerenja.

Tablica 7. Proračun pripreve standarda u limunskoj kiselini pri $\text{pH} \approx 4$ na $\lambda = 484$ nm.

Standardna otopina	Bojilo, mL	H ₂ O, mL	Uzorak, mL	Masena koncentracija bojila, mg/L	Masena koncentracija standarda, mg/L	Apsorbancija
1.	0,5	99,5	100	150,7	0,7535	0,0335
2.	1,5	98,5	100	150,7	2,2605	0,1087
3.	2,5	97,5	100	150,7	3,7675	0,1808
4.	5	95	100	150,7	7,535	0,3574
5.	7,5	92,5	100	150,7	11,3025	0,5326

Tablica 8. Koncentracije uzoraka dobivene spektrofotometrijskim mjerenjem

Uzorci	Masena koncentracija, mg/L	Apsorbancija
<i>Haribo žuti</i>	0,4419	0,0218
<i>Haribo narančasti</i>	0,5306	0,0259
<i>Strepsils</i>	2,0147	0,0959
<i>Sok TO</i>	10,283	0,486
<i>Fanta</i>	4,2851	0,203
<i>Cedevita</i>	8,915	0,4214
<i>Isotonic</i>	10,0606	0,4755



Slika 15. Krivulja umjeravanja uzoraka otopljenih u limunskoj kiselini i pri $\lambda=484$ nm.

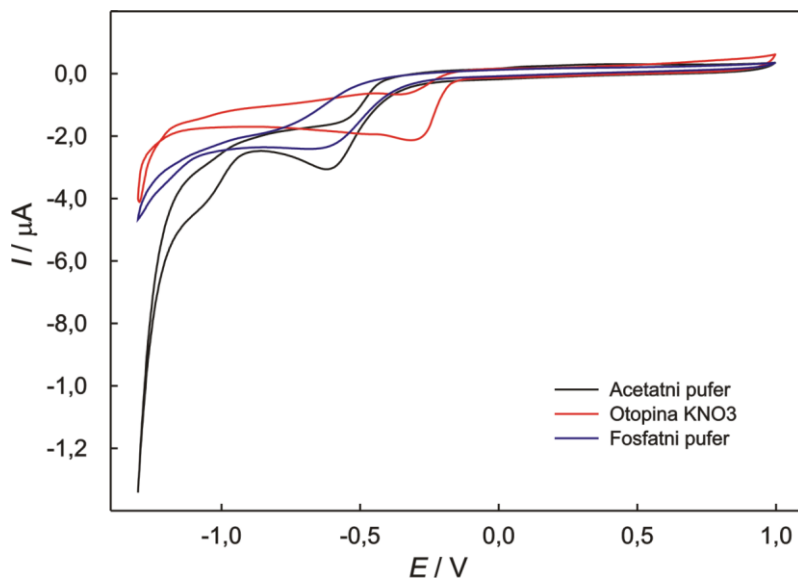
Usporedbom izmjerenih koncentracija uzoraka u limunskoj kiselini i u vodi, pri valnoj duljini od 484 nm, zaključujemo da nema velike razlike u koncentracijama. Iz toga također zaključujemo da se ovi dobiveni podatci podudaraju s podatkom u literaturi, da se pik pojavljuje pri valnoj duljini od 484 nm.

3.2. Voltametrijske metode određivanja Sunset Yellow-a

3.2.1. Ciklička voltametrija

Za dobivanje osnovnih informacija, o elektrokemijskom ponašanju odabrane elektrode snimljeni su ciklički voltamogrami na elektrodi od staklastog ugljika u različitim elektrolitima. Prije snimanja elektroda je aktivirana u dušičnoj kiselini.

Predtretmanom u odabranom elektrolitu na potencijalu 1,0 V u trajanju od 60 s neposredno prije snimanja oksidiraju se eventualne nečistoće s površine elektrode. Ciklički voltamogrami snimani su od startnog potencijala 0,0 V u katodnom smjeru do -1,3 V, te povratno u anodnom smjeru do 1,0 V i završno do potencijala 0,0 V, brzinom promjene potencijala od 25 mV s^{-1} .



Slika 16. Prikaz i usporedba tri elektrolita bez dodatka standardne otopine Sunset Yellow

Za odrediti pogodan elektrolit, vodili smo se literaturnim podacima o potencijalima moguće oksidacije i redukcije Sunset Yellow-a, u širokom području potencijala. Kod izbora najpogodnijeg elektrolita za odvijanje elektrokemijske reakcije, mora se voditi računa o tome da ne dolazi do pojave smetnje tj. šumove i da ne dođe do redukcije određenih vrsta iz elektrolita u području potencijala u kojem očekujemo redukciju odnosno oksidaciju Sunset Yellow-a. Iz cikličkog voltamograma je vidljivo da se u otopini acetatnog pufera vodik počinje reducirati na površini elektrode mnogo ranije nego iz drugih elektrolita, te da postoji mogućnost redukcije Ac^- ili njegove adsorpcije, na potencijalu bliskom potencijalu redukcije Sunset Yellow-u.

U otopini fosfatnog pufera može se uočiti moguća redukcija fosfatnih vrsta iz otopine ili adsorpcija istih također na potencijalima bliskim potencijalu redukcije našeg analita.

Kada smo kao elektrolit koristili $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopinu KNO_3 rezultat je bio najstabilniji odziv elektrode, bez prisutnih šumova, te je primijećeno kako u području redukcije analita nije zabilježena nikakva promjena struje na cikličkom voltamograma koja bi mogla interferirati s analitom.

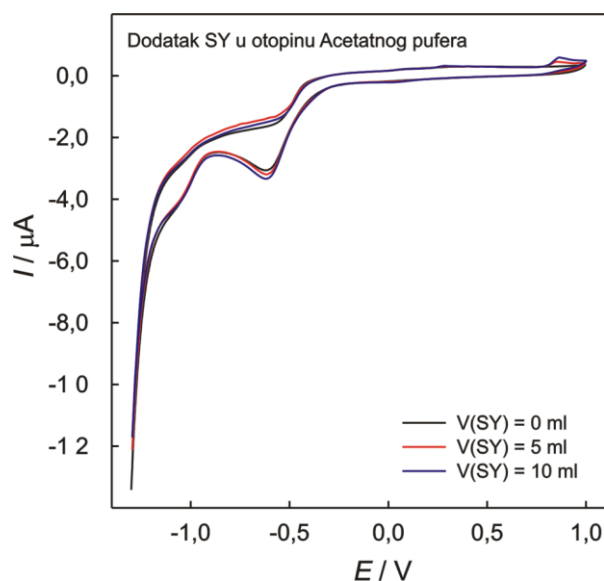
Usporedbom dobivenih voltamograma izveden je zaključak kako bi najprikladniji elektrolit za određivanje SY redukcijom bila $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina KNO_3 .

Kako se sva tri odabrana elektrolita ponašaju slično u području oksidacije SY izbor elektrolita u analitičke svrhe zahtijevao je studij dodatka SY u sva tri odabrana elektrolita, te su dobiveni sljedeći ciklički voltamogrami: (Slika 17, Slika 18 i Slika 19).

Na slikama *Slika 17*, *Slika 18* i *Slika 19* prikazane su serije cikličkih voltamograma bez i uz dodavanje SY u obrocima:

- 5 mL gdje je ukupna koncentracija SY koncentracija otopine iznosi 7,535 mg/L
- 10 mL Sunset Yellow-a, koncentracija otopine iznosi 15,07 mg/L

Koncentracija standardne otopine SY je bila 0,1507 g/L, te se dodatkom 1 mL Sunset Yellow-a u elektrokemijsku ćeliju volumena 100 ml postiže koncentracija 1,507 mg/L.

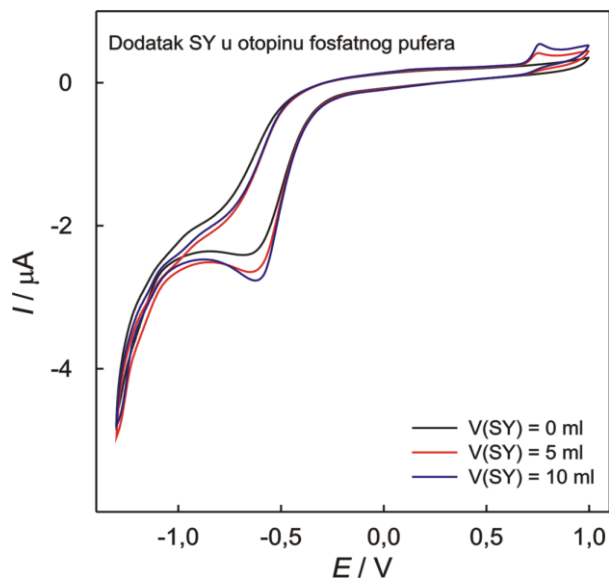


Slika 17. Usporedba bez i sa dodatkom 5 i 10 ml standardne otopine Sunset Yellow, u otopinu acetatnog pufera.

Iz dobivenih cikličkih voltamograma na *Slici 17*, je vidljivo da kada u otopini acetatnog pufera nema prisutnog SY, pojavljuje se samo jedan katodni strujni vrh koji odgovara redukciji iz elektolita.

Dodatkom SY dolazi do pojave i sukcesivnog rasta jednog jasno definiranog anodnog strujnog vrha u području potencijala od 0,82 – 0,84 V, koji se pripisuje oksidaciji hidrokso grupe iz SY u odgovarajući kinon.

Do redukcije, tj. pojave strujnog vrha u katodnom dijelu, dolazi pri potencijalu -0,588 V. Vidimo da pri sličnom potencijalu dolazi do redukcije Ac^- i do redukcije prisutnog bojila, čime potvrđujemo pretpostavku kako je acetatni pufer je dosta nepouzdan elektroanalizu ovog umjetnog bojila u području redukcije.

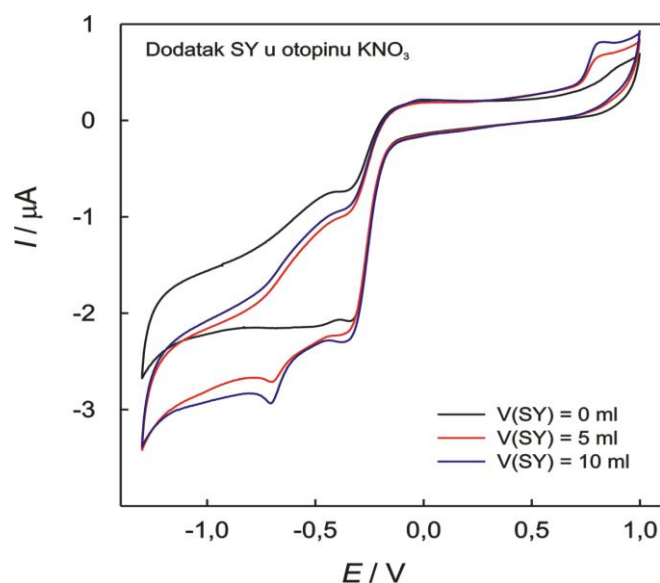


Slika 18. Usporedba bez i sa dodatkom standardne otopine Sunset Yellow u otopinu fosfatnog pufera

Dodatkom SY u otopinu fosfatnog pufera dobiveni su ciklički voltamogrami prikazani na *Slici 18*, te je vidljivo da kada u otopini nema prisutnog SY pojavljuje se samo jedan katodni strujni vrh koji odgovara redukciji iz elektolita.

Dodatkom SY dolazi do pojave i sukcesivnog rasta anodnog strujnog vrha na potencijalu 0,732 V, koji se pripisuje oksidaciji ugljikovog atoma s hidrokso skupinom u kinon, te rasta već prisutnog katodnog strujnog vrha pri potencijalu od -0,590 V.

Kao i kod acetatnog pufera fosfatni pufer nam nije pouzdan, iz razloga što imamo pojavu strujnog vrha na skoro istom potenciju i bez i sa dodatkom standardne otopine Sunset Yellow. Za strujni vrh bez dodatka umjetnog bojila, pretpostavljamo da se radi o redukciji fosfatnih vrsta iz otopine. Iz razlike bi se mogla utvrditi koncentracija analita, ali sama pojava više reducibilnih vrsta niti ovaj pufer ne čini dobrim izborom za elektroanalitičke svrhe.



Slika 19. Usporedba bez i sa dodatkom standardne otopine Sunset Yellow u otopinu KNO_3

Iz dobivenih rezultata možemo uočiti, kako do oksidacije SY dolazi pri potencijalu 0,780 V, što je pogodan potencijal za elektroanalitička mjerenja.

Zapažena su dva redukcijska strujna vrha. Prvi pri potencijalu -0,344 V, koji nam je nepouzdan, jer se pri tom potencijalu pojavio strujni vrh sa i bez dodatka umjetnog bojila koji može biti posljedica promjene na elektrodnoj površini. Međutim na potencijalu -0,688 V, vidimo kako postoji strujni vrh koji raste dodatkom SY. Uvidom u literaturu možemo zaključiti kako na tom potencijalu dolazi do redukcije, odnosno hidrogenacije azo-skupine.

Iz provedenih preliminarnih mjerenja izveli smo sljedeće zaključke:

- Za elektroanalitička mjerenja odabrani elektrolit je $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina KNO_3
- Pouzdan redukcijski potencijal je -0,688 V
- Pouzdan oksidacijski potencijal je 0,780 V.

3.2.2. Rezultati analitičke primjene

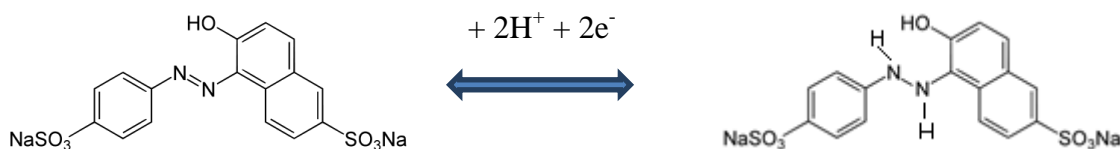
Različite analitičke metode predložene su za otkrivanje i kvantificiranje umjetnih bojila. Jedna od najčešće upotrebljivanih metoda je HPLC metoda, sa različitim metodama detekcije (UV detekcija, masena spektroskopija, kromatografija), te kapilarna elektroforeza i jednostavni ELISA test.

Uslijed potrebe pronalaska jednostavne, osjetljive i brze metode prepoznavanja i određivanja Sunset Yellow – umjetnog bojila interesantno je bilo studirati njegovo elektrokemijsko ponašanje. Kratki pregled metoda dan u *Tablici 9* pokazuje mogućnost određivanja SY.

Tablica 9. Kratak pregled voltametrijskih metoda za određivanje SY

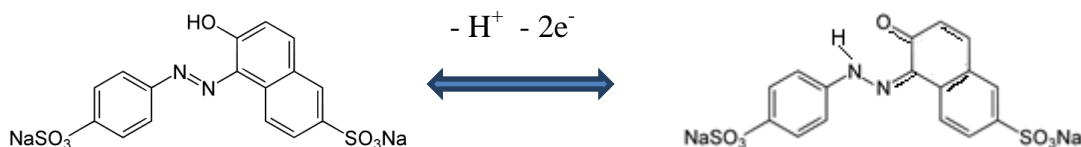
Elektroda	Potencijal određivanja E / V	pH	Linearno područje μM	Granica detekcije μM
Kapajuća živina elektroda	-0,60	10	0,011-0,2	0,011
Ugljikove nanočestice na glassy carbon elektrodi	-0,72	8,3	2,7	1,1
poly (L-cysteine) / na glassy carbon elektrodi	0,733	6,6	0,008–0,7	0,004
Grafen	0,78	4,0	0,1–2,0	0,03
Elektroda od grafitne ekspanzirane paste	0,66	6,0	0,05–2,0	0,005
Nanočestice zlata na elektrodi od ugljikove paste	0,75	4,0	0,1–2,0	0,03

Reakcija redukcije SY može se prikazati na sljedeći način:



Iz voltametrijskog ponašanja zaključeno je kako je potencijal odvijanja ove reakcije približno -0,690 V na elektrodi od staklastog ugljika u otopini KNO_3 .

Reakcija oksidacije SY u promatranom području potencijala prema literaturi odgovara oksidaciji hidroksidne skupine u odgovarajući kinon prema reakciji:



Iz voltametrijskog ponašanja zaključeno je kako je potencijal odvijanja ove reakcije približno 0,780 V na elektrodi od staklastog ugljika u otopini KNO_3 . Kao metoda koja

se koristila u analizi boja, odabrana je pravokutna voltometrija katodnog otapanja (SWCSV). Procedura za SWCSV ustanovljena je praćenjem parametara koji utječu na signal odziva, odnosno optimiranjem vremena akumulacije (t_{akum}), potencijala akumulacije (E_{akum}), te amplitude pravokutnog naponskog impulsa (ΔE_p) u odnosu na potencijal pomaka (ΔE_s) i frekvencije impulsa (f). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici

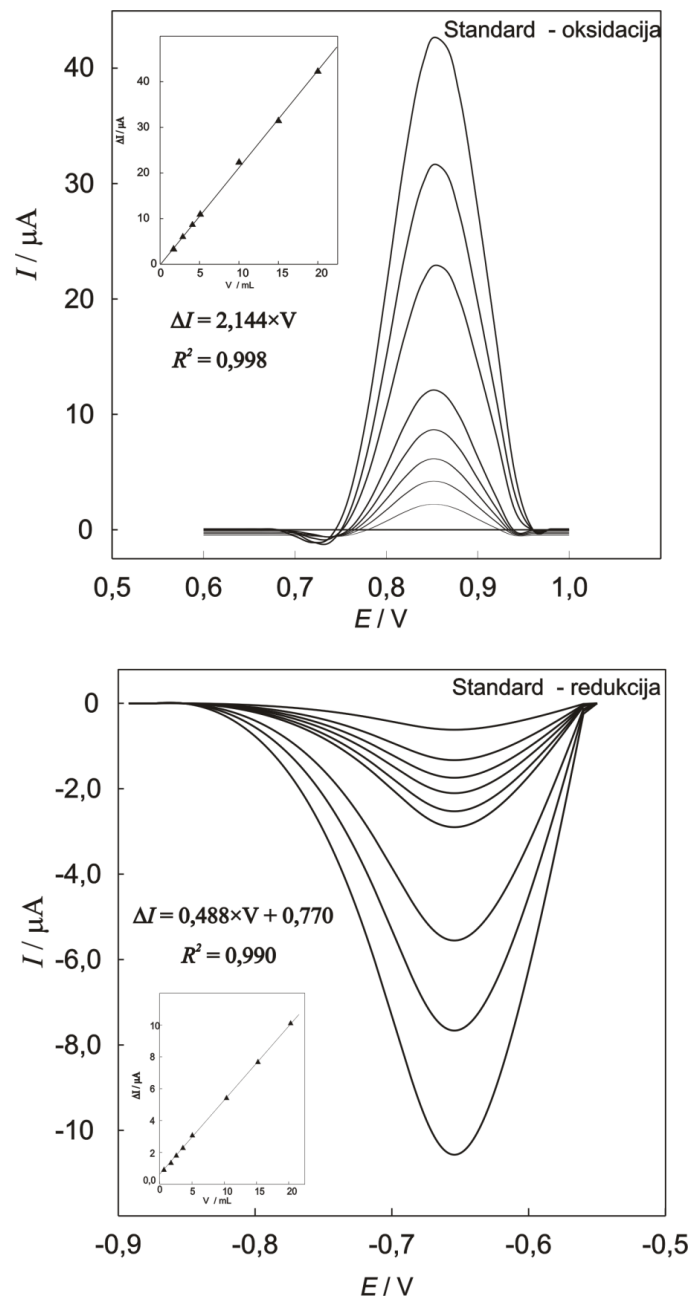
Tablica 10. Odabrani parametri SWCSV za određivanje folne kiseline.

	t_{aq} / s	E_{akum} V	pH	f Hz	ΔE_s mV	ΔE_p mV
Za reakciju redukcije	60 s uz miješanje i propuhivanje i 10s u mirujućem elektrolitu	-0,55	4,5	10	10	50
Za reakciju oksidacije	60 s uz miješanje i propuhivanje i 10s u mirujućem elektrolitu	0,00	4,5	30	20	100

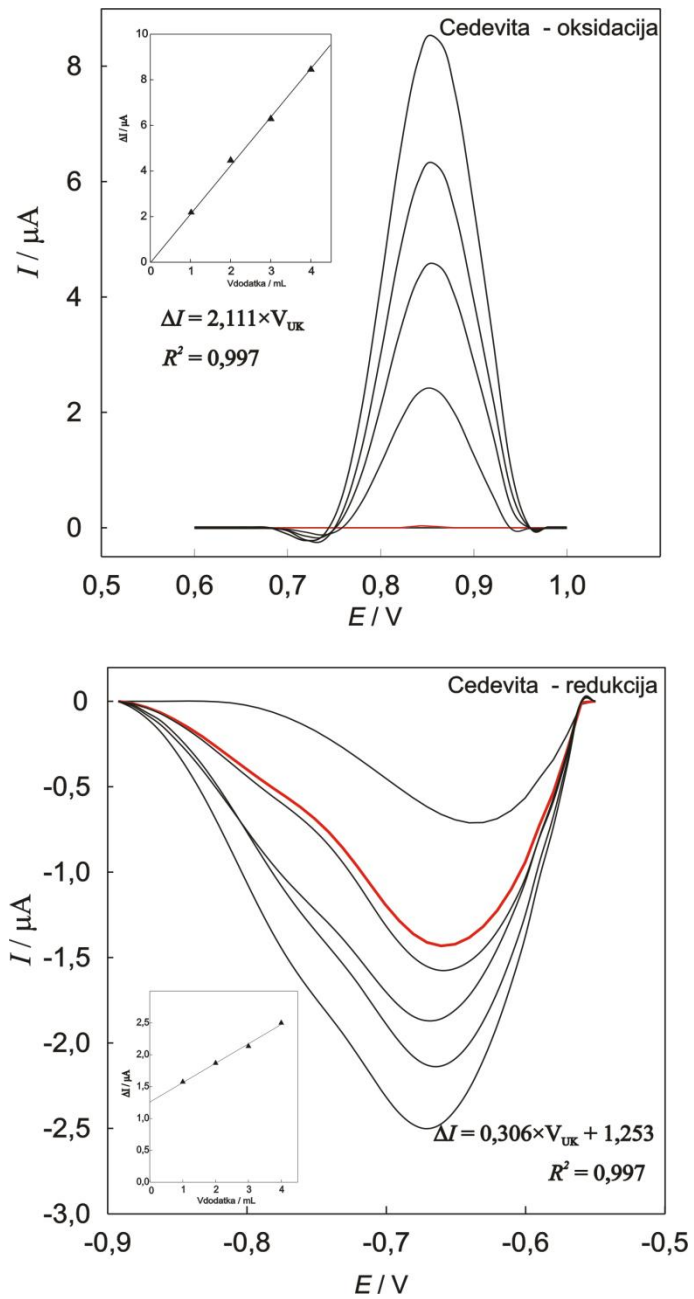
Na *Slici 20.* prikazani su rezultati dobiveni snimanjem voltamograma metodom SWCSV, za SY, s pripadajućom krivuljom umjeravanja za oksidaciju i redukciju u širem koncentracijskom području. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti kako unutar promatranog koncentracijskog područja u kojem očekujemo i rezultate analitičke primjene struja oksidacije / redukcije SY raste linearno s promjenom koncentracije.

Uzorcima su pripremljeni kao i kod spektrofotometrijskih mjerenja, te je 2 ml uzorka stavljeno u elektrokemijsku ćeliju volumena 100 ml.

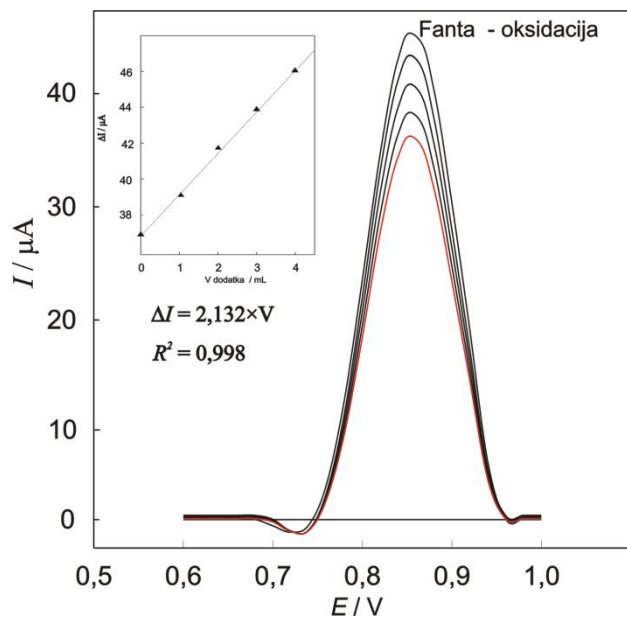
Dobiveni rezultati prikazani su na sljedećim Slikama 21-25. Detalj na svim grafovima predstavlja ovisnosti strujnog vrha o volumenu dodatka SY, gdje odsječak na ordinati odgovara vrijednosti struje oksidacije SY, na osnovu koje je izračunata nepoznata koncentracija. SY je sukcesivno dodavan nakon dodanog uzorka u obrocima od 1 mL uz eksperimentalne uvjete dobivene optimiranjem.



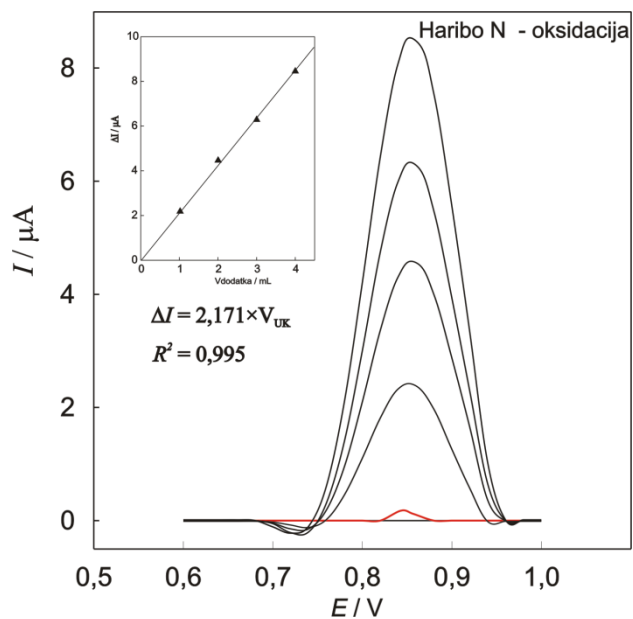
Slika 20. Voltamogrami SWCSV korigirani za vrijednost osnovne struje snimljeni na GCE u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopini KON_3 uz sukcesivni dodatak SY.



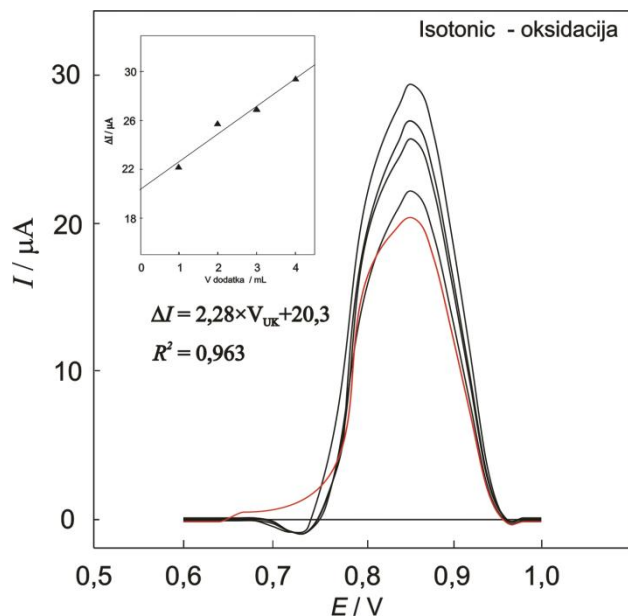
Slika 21. SWCSV–voltamogrami (korigirani za vrijednost bazne linije) snimljeni na GC elektodi u otopini KNO_3 u svrhu određivanja nepoznate koncentracije SY u realnom uzorku *Cedevite* metodom standardnog dodatka.



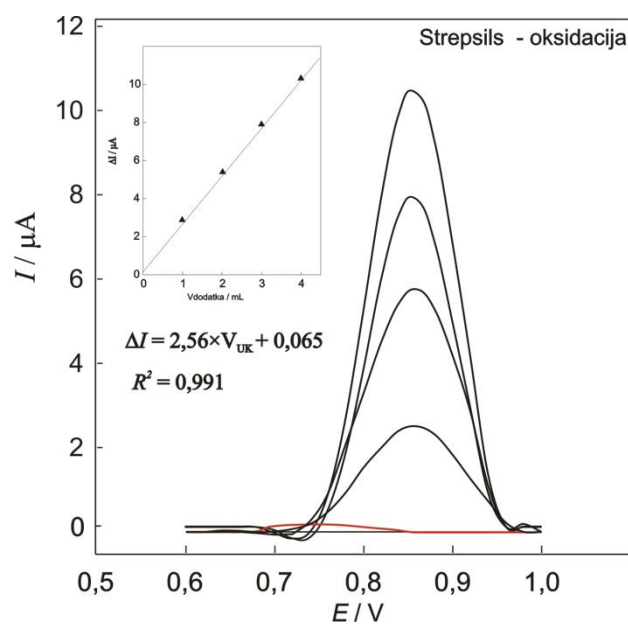
Slika 22. SWCSV–voltamogrami (korigirani za vrijednost bazne linije) snimljeni na GC elektodi u otopini KNO_3 u svrhu određivanja nepoznate koncentracije SY u realnom uzorku *Fante* metodom standardnog dodatka.



Slika 23. SWCSV–voltamogrami (korigirani za vrijednost bazne linije) snimljeni na GC elektodi u otopini KNO_3 u svrhu određivanja nepoznate koncentracije SY u realnom uzorku *Haribo* metodom standardnog dodatka..



Slika 24. SWCSV–voltamogrami (korigirani za vrijednost bazne linije) snimljeni na GC elektodi u otopini KNO_3 u svrhu određivanja nepoznate koncentracije SY u realnom uzorku *Isotonic - a* metodom standardnog dodatka.



Slika 25. SWCSV–voltamogrami (korigirani za vrijednost bazne linije) snimljeni na GC elektodi u otopini KNO_3 u svrhu određivanja nepoznate koncentracije SY u realnom uzorku *Strepsils pastila* metodom standardnog dodatka.

Metodom standardnog dodatka izrađene su krivulje umjeravanja za sve ispitivane uzorke, te su dobivene koncentracije SY u uzorcima na osnovu redukcije i oksidacije

analita prikazane u *Tablici 11*. **Tablica 11.** Dobivene koncentracije SY u uzorcima na osnovu redukcije i oksidacije analita

Uzorak	Koncentracija na osnovu struje redukcije	Koncentracija na osnovu struje oksidacije
FANTA	77,8 mg/L	26,3 mg/L
ISOTONIC	83,6 mg/L	14,5 mg/L
SOK TO	186,9 mg/L	Nije nađeno
HARIBO (ŽUTI)	33500 mg/kg	Nije nađeno
HARIBO (NARANČASTI)	325005 mg/kg	48 mg/kg
CEDEVITA	509009 mg/kg	17,7mg/kg
STREPSILS PASTILE	9100 mg/kg	91,03 mg/kg

Predložene metode primijenjene su za određivanje SY-a u sokovima, farmaceutskim pripravcima i gumenim bombonima. U odabranim uzorcima, gdje je po deklaraciji djelatna tvar prisutna u manjem ili većem masenom udjelu, uz SY bojilo bila su prisutna i druga bojila dozvoljena za konzumaciju.

U *Tablici 12* slijedi usporedba koncentracija dobivenih spektrofotometrijskim i voltametrijskim određivanjem.

Tablica 12. Usporedba metoda

Uzorak	Koncentracija na osnovu spektrofotometrijskih mjerenja	Koncentracija na osnovu struje redukcije	Koncentracija na osnovu struje oksidacije	Literaturni podaci/prema deklaracijama proizvoda
FANTA	15,36 mg/L	77,8 mg/L	26,3 mg/L	30 mg/L
ISOTONIC	48,08 mg/L	83,6 mg/L	14,5 mg/L	2,7 mg/L
SOK TO	35,52 mg/L	186,9 mg/L	Nije nađeno	-----
HARIBO(ŽUTI)	39,82 mg/kg	33500 mg/kg	Nije nađeno	-----
HARIBO (NARANČASTI)	46,95 mg/kg	32500 mg/kg	48 mg/kg	Od 8 do 17 mg/kg
CEDEVITA	240,7 mg/kg	50900mg/kg	17,7 mg/kg	-----
STREPSILS PASTILE	45,45 mg/kg	9100 mg/kg	91,03 mg/kg	81mg/kg

Iz *Tablice 12* je vidljivo kako primjenom voltametrijske metode u području redukcije SY dobiveni rezultati nisu se pokazali usporedivim te se iz tog razloga ne mogu uzeti relevantnima.

Primjenom voltametriske metode u području oksidacije SY u soku TO i Haribo žutim bombonima, bojilo SY nije pronađeno.

Koncentracije za ta dva uzorka dobivene spektrofotometrijski, u granicama su dozvoljenih vrijednosti prema zakonskoj regulativi (*Vidi Tablica 2*). U Haribo žutim bombonima je na deklaraciji navedeno da sadrže E104, Kinolinsko žuto, E124, Košenil crveno A, koji se spektrofotometrijski određuju na valnim duljinama od 420-500 nm, pa se koncentracija dobivena spektrofotometrijskom metodom, ne može sa sigurnošću pripisati postojanju SY.

Slično možemo zaključiti i za uzorak cedevite, jer je voltametrijskom metodom određena koncentracija od 17,7 mg/kg, dok je spektrofotometrijski dobivena koncentracija znatno veća (240,7 mg/kg). Iako je dobivena koncentracija SY u uzorku cedevite ispod dopuštene granice (300 mg/kg), deklaracijom je navedeno kako cedevita ne sadrži SY i narančasto-crvena boja cedevite vjerojatno potječe od dodatka bojila skupine karotenoida. Literaturno je pronađeno da se karotenoidi mogu spektrofotometrijski odrediti pri valnoj duljini oko 455 nm. Obzirom na valnu duljinu pri ovim mjerenjima, koja je iznosila 484 nm, moguće je da ovako visoka koncentracija bojila u uzorku cedevite potječe od skupine karotenoida, a ne od SY.

Isto se može primijetiti i za uzorak Isotonic, gdje je i spektrofotometrijski i voltametrijski dobivena koncentracija ispod dopuštene vrijednosti (50 mg/L), dok je koncentracija prema deklaraciji dosta niža (2,7 mg/L).

Rezultati sigurnosne procjene bojila u RH ukazuju da SY pripada drugoj sigurnosnoj skupini u kojoj je utvrđeni unos aditiva daleko ispod razine prihvatljivog dnevnog unosa ADI (Acceptable daily intake)²⁰.

4. ZAKLJUČAK

- Obje metode su pokazale mogućnost određivanja umjetnog bojila SY u prehrambenim proizvodima.
- Tijekom spektrofotometrijskih ispitivanja tekućih realnih uzoraka, najveće koncentracije SY nađene su u Fanti (15,36 mg/L) i soku TO (35,52 mg/L) i ulaze u pravilnikom dopuštene vrijednosti.
- Tijekom spektrofotometrijskih mjerenja, uočena je mogućnost određivanja i prirodnih bojila (poput β - karoteonida).
- Primjenom voltametrijske metode redukcije SY dobiveni rezultati su iznad dopuštenih granica, pa se ta metoda ne može smatrati pogodnom za određivanje SY.
- Voltametrijska ispitivanja su pokazala da su pogodna za određivanje SY u tekućim realnim uzorcima.
- Prilikom ispitivanja tekućih realnih uzoraka voltametrijskim metodama, najveće koncentracije SY su nađene u fanti (26,3 mg/L) i u isotonic-u (14,5 mg/L), što ulazi u pravilnikom dopuštene vrijednosti.
- Dobiveni rezultati za tekuće uzorke su pokazali dobru podudarnost s podacima dobivenim na deklaracijama.
- Spektrofotometrijskim i voltametrijskim ispitivanjem krutih realnih uzoraka, najveće koncentracije su uočene u Haribo (narančastim) bombonima (46,95 mg/kg i 48 mg/L) i u Strepsils pastilama (45,45 mg/kg i 91,03 mg/kg).
- Spektrofotometrijski dobivene koncentracije, za haribo narančaste bombone i za strepsils pastile, ulaze u pravilnikom dopuštene vrijednosti.
- Rezultati krutih uzoraka, ispitivanih voltametrijskim metodama, ukazuju na postojanje interferencija s drugim prisutnim bojilima, jer su svi dobiveni rezultati veći od deklariranih vrijednosti.
- Sve spektrofotometrijski i voltametrijski dobivene koncentracije uzoraka su ispod dopuštenih vrijednosti prema pravilniku *HAH-Z-2012-07,2014*, Osijek i prema vrijednostima koje je propisala Europska unija.
- Rezultati sigurnosne procjene bojila u RH ukazuju da SY pripada drugoj sigurnosnoj skupini u kojoj je utvrđeni unos aditiva daleko ispod razine prihvatljivog dnevnog unosa.

5. LITERATURA

- [1] <http://www.chemie.de/lexikon/Lebensmittelfarbstoff.html/> (15.09.2016).
- [2] E. Dinnc, E. Baydan, M. Kanbur, F. Onur, *Talanta* **2002**, 58, 579 - 594
- [3] M.S. El-Shahawi, A. Hamza, A.A. Al-Sibaai, A.S. Bashammakh, H.M. Al-Saidi, *J. Ing. Eng. Chem* **2013**, 19, 529 - 535
- [4] Y. Ni, X. Gong, *Analytica Chimica Acta* **1997**, 354, 163 - 171
- [5] R. Wood, L. Foster, A. Damant, P. Key, *Analytical methods for food additives* **2004**, pp. 17 - 19
- [6] A. Gredelj, *Organska sintetska bojila u odabranim proizvodima za osobnu higijenu – negativan utjecaj na zdravlje i okoliš* **2013**, 87, Varaždin, 3 - 9
- [7] J.Böcher, *Die Chemie der Farbstoffe* **2006**, 31, Weimar, 3 - 21
- [8] I. Gudelj, J. Hrenović, T. Landeka Dragičević, F. Delaš, V. Šoljan i H. Gudelj, *Arh Hig Rada Toksikol* **2011**, 62, 91 - 101
- [9] P. Meštrović, *Sinteza novih heterocikličkih azo naftosulfonskih bojila i njihova primjena na tekstilnim supstratima* **2013**, 54, Zagreb, 3 - 9
- [10] https://tkojetko.irb.hr/documents/16691_2078.pdf/ (15.09.2016.)
- [11] <http://e-brojevi.udd.hr/110.htm/>(15.09.2016.)
- [12] www.chemie.uni-hamburg.de/(15.09.2016.)
- [13] <https://energy-drink-magazin.de/2014/04/gelborange-s-e110-14358/>(16.09.2016.)
- [14] http://www.food-detektiv.de/e_nummer_ausgabe.php?id=15/(16.09.2016.)
- [15] <https://www.lebensmittellexikon.de/g0002790.php#1/>(16.09.2016.)
- [16] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije* **1969**, 968, Zagreb, Školska knjiga, 491 - 536
- [17] I. Malenica, *Nove elektrokemijske metode za određivanje ropinirola* **2012**, 56, Zagreb, 5 - 12.
- [18] N. Vladislavić, *Razvoj bizmutovih film-elektroda za određivanje organskih tvari u vodenom mediju* **2013**, 187, Zagreb, 20 – 43
- [19] http://www.periodni.com/enig/potencimetrijski_senzori.html/(17.09.2016.)
- [20] Znanstveno mišljenje o prehranbenim aditivima, *Zahtjev HAH-Z-2012-07*, **2014**, Osijek