

Pregled instrumentnih analitičkih metoda pri utvrđivanju autentičnosti uzoraka hrane

Benčić, Noelle

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:254181>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Noelle Benčić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**PREGLED INSTRUMENTNIH
ANALITIČKIH METODA PRI
UTVRĐIVANJU AUTENTIČNOSTI
UZORAKA HRANE**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

26. kolovoza 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

22. rujna 2017.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Autentifikacija hrane.....	1
1.1.1. Definicija autentifikacije hrane.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Analitičke metode.....	2
2.1.1. Molekularne tehnike – genomika-proteomika	2
2.1.2. Kromatografske tehnike.....	3
2.1.3. Izotopne tehnike.....	4
2.1.4. Vibracijska i fluorescencijska spektroskopija	5
2.1.5. Analitička elementarna analiza	6
2.1.6. NMR.....	7
2.1.7. Senzorna analiza	8
2.1.8. Masena spektrometrija	9
2.1.9. Imunološke tehnike	10
2.1.10. Kemometrika i bioinformatika.....	11
2.2. Istraživački trendovi	12
2.2.1. Analitičke tehnike koje se koriste za autentifikaciju hrane.....	13
2.1.2. Istraživačka aktivnost širi se u državama diljem svijeta	15
2.1.3. Znanstveni časopisi	17
§ 2. ZAKLJUČAK	18
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	19

§ Sažetak

Zbog povećanja svijesti ljudi o važnosti kvalitete i sigurnosti hrane, autentifikacija hrane postaje sve zanimljivije i važnije područje analitičke kemije. Ovaj rad prikazuje analitičke tehnike koje se koriste za procjenu autentičnosti prehrambenih proizvoda. Opisane su različite metode i postupci. Isto tako, razmatraju se analitička otkrića i nove tehnike koje su nedavno nastale, zajedno sa njihovom primjenom na autentičnost prehrambenih proizvoda. Pokazano je da sve veću ulogu kod autentifikacije ima i informatička kemija tj. da postoji informatička potreba za analizom podataka većih količina.

Postoje određeni standardi izvješćivanja i referentna baza podataka koji ukazuju na hitne potrebe za napretkom ovog područja. Istaknuti su trendovi istraživanja i novi pristupi tog razvojnog polja. Navedene su popularne analitičke tehnike, vremenska evolucija istraživačke proizvodnje usmjerene na geografsku raspodjelu istraživačke aktivnosti i publikacija te popularni časopise koji pišu o toj temi.



Slika 1. Ispitivanje autentičnosti i sigurnosti hrane

Izvor: www.foodqualitynews.com/industry-news/LGC-to-coordinate-Virtual-Food-Authenticity-Network (datum pristupa 20. lipnja 2017.)

§ 1. UVOD

1.1. Autentifikacija hrane

1.1.1. Definicija autentifikacije hrane

Autentifikacija hrane proces je koji potvrđuje da je određeni prehrambeni proizvod u skladu sa svojom deklaracijom. To uključuje porijeklo hrane, metodu proizvodnje i procese obrade. Dokaz o porijeklu hrane bitan je zbog kvalitete, sigurnosti hrane te zaštite potrošača, ali i za usklađenost sa zakonodavstvom i međunarodnim standardima. Uslijed globalizacije tržišta hrane došlo je do povećane dostupnosti i izbora proizvoda hrane iz puno zemalja. Potrošači žele znati sve više o geografskom porijeklu i kvaliteti prehrambenih proizvoda koje konzumiraju. Želi se osigurati što veća kvaliteta i žele se upotrijebiti najbolje metode pri autentifikaciji hrane zbog komercijalnih i legalnih razloga.

Još od antičkih vremena autentifikacija hrane predstavljala je veliku brigu za potrošače i proizvođače. Moderni instrumenti, dostignuća u znanosti, informatici i komunikacijskim tehnologijama osigurali su sredstva za točna mjerenja i opisivanje podrijetla hrane. Početkom dvadesetog stoljeća po čitavom svijetu pojavile su se različite organizacije koje postavljaju standarde i kontroliraju podrijetlo sastojaka te čitavog proizvodnog procesa. Neke od takvih organizacija su npr. francuski 'Institut National des Appellations d'Origine' (INAO), talijanski 'Denominazione di Origine Controllata', španjolski 'Denominación de Origen', južno afrički 'Wine of Origin' te američki 'American Viticultural Areas'. Proizvodnja potrošačke robe prema standardiziranim procedurama rezultira boljim proizvodima i to za sobom povlači više cijene prodaje. Zarada je razlog želje za proizvodnjom krivotvorina proizvoda, te ilegalno trgovanje hranom. Jedan od glavnih problema autentifikacije u Europi je podrijetlo hrane. Određivanje autentičnosti hrane važan je problem kontrole kvalitete i sigurnosti hrane. Autentifikacijsko testiranje je kriterij za kvalitetu hrane i sastojaka hrane i njime se bavi zakonodavstvo o zaštiti regionalne hrane. Zbog toga postoji potreba za točnim standardiziranim tehnikama autentifikacije. Vlade traže produžene i ažurirane popise analitičkih metoda za potvrđivanje autentičnih prehrambenih proizvoda te za provedbu različitih zakona.^{1,2}



Slika 2. GMO testiranje

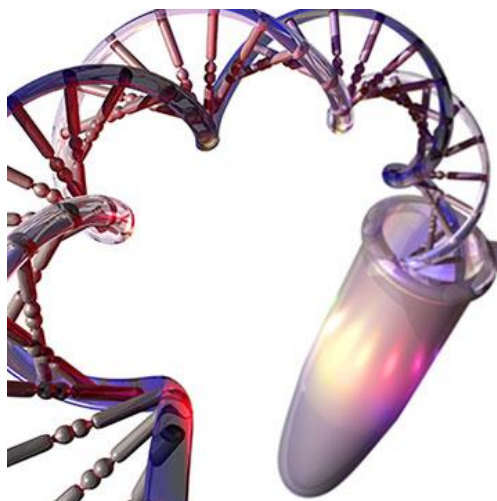
Izvor: <https://www.genetic-id.com/> (datum pristupa 2. srpnja 2017.)

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Analitičke metode

2.1.1. Molekularne tehnike – genomika-proteomika

Razvijene su i testirane različite analitičke tehnike i provjere vezane za prehrambeno podrijetlo. Molekularna analiza koristi se za prepoznavanje izvornih prehrambenih proizvoda od krivotvorenih. Iako se tradicionalne analitičke metode koriste za autentifikaciju hrane, genomska i proteomska tehnika u zadnje vrijeme sve više nadopunjuju ili zamjenjuju ranije korištene metode. Budući da je DNA identična u svim somatskim stanicama određenog organizma, ona je nepromjenjiva bez obzira na to da li je DNA izvađena iz krvi, mišića, jetre ili nekog drugog tkiva. Visoka stabilnost DNA omogućuje analizu visoko obrađenih prehrambenih proizvoda, kao i onečišćenja u tragovima. Metode za provjeru autentičnosti hrane temeljene na DNA ovise o visoko specifičnoj amplifikaciji DNA fragmenata polimeraznom lančanom reakcijom (PCR). Ova metoda pripada genomici jer se koristi cijeli genom uzorka. S druge strane, proteini mogu djelovati kao markeri za mnoga svojstva prehrambenih proizvoda duž čitavog hranidbenog lanca od farme do tanjura, pa se stoga proteomika može primijeniti za sustavno pretraživanje novih marker proteina ili peptida. Prednost genomike je da može pojačati minutne tragove nukleotidnog materijala, dok proteomika identificira specifične proizvode kodirane pomoću DNA. Osjetljivost ovih metoda je vrlo visoka, jer količina potrebnog materijala može biti veličine samo nekoliko stanica. Za ciljanu detekciju i kvantifikaciju karakterističnih markera u stvarnim nepoznatim uzorcima potrebne su pouzdane analitičke metode, a prvi korak je otkrivanje pomoću referentnih uzoraka. Ove proteogene tehnike stalno se poboljšavaju. Genomika i proteomika se obično primjenjuju kako bi se utvrdile lažne deklaracije i pogrešno označavanje hrane. Zanimljivi primjeri su: otkrivanje GMO-a, autentifikaciju morske hrane, otkrivanje konjskog mesa i svinjetine u hrani koje je označeno kao goveđe meso, autentifikaciju mesa divljači, botaničko podrijetlo hrane (maslinovo ulje, vino, proizvodi rajčice, čaj i kakao), autentičnost podrijetla vrsta (meso, mlijeko, riba). Sve popularnije polje proteogenomike je metoda otiska prstiju koja se koristi za autentifikaciju hrane. Za ove vrste studija koristi se tehnika PCR-DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). To se koristi za određivanje autentičnosti kod određenih prehrambenih proizvoda poput sira, voća, mlijeka i drugih mliječnih proizvoda, vina, kakaa te organske hrane.^{1,3}



Slika 3. DNA

Izvor: <http://www.carolinabiosystems.cz/en/39-products> (datum pristupa 2. srpnja 2017.)

2.1.2. Kromatografske tehnike

Kromatografija općenito je tehnika u kojoj se sastojci smjese odjeljuju ovisno o brzinama kojima ih plinovita ili tekuća mobilna faza nosi kroz kolonu stacionarne faze.⁴ Kromatografska analiza omogućuje brzo i pouzdano razdvajanje kemijski sličnih spojeva nutritivnih i nenutritivnih komponenata hrane. Kod provjere autentičnosti hrane kromatografske tehnike moraju prevladati nekoliko prepreka. Sastojci hrane sastoje se od velikog broja spojeva, uključujući peptide, lipide, ugljikohidrate, aminokiseline, masne kiseline, organske kiseline, nukleinske kiseline i druge male molekule (aditive kao što su bojila, arome, konzervanse, itd.). Ti spojevi su kemijski vrlo različiti, od malih organskih molekula (obično do 1000 Da) do makromolekula (biopolimeri). Oni mogu posjedovati širok raspon polariteta, neki su apolarni (poput ulja) dok su neki drugi jako polarni (poput aminokiselina). Kromatografske metode proizvode jedinstvene kemijske otiske prstiju koji se razlikuju i autenticiraju hranu.

Plinska (GC) ili tekućinska kromatografija (LC) povezane sa spektrometrijom masa (MS), pojavile su se kao korisni alati za provjeru autentičnosti hrane. Većina instrumenata koja se koristi su plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS / MS), tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS / MS ili LC-TOF-MS). Odvajanje tekućinskom kromatografijom obično se izvodi na temelju polarosti, naboja i molekularne veličine. Najčešće se koristi za otkrivanje proteina, aminokiselina, ugljikohidrata, vitamina i pigmenata. S druge strane, plinska kromatografija prikladnija je za analizu prirodno isparljivih ili polu-hlapivih molekula.

Autentifikacija kromatografskim metodama bazira se na profiliranju tj. stvaranju specifičnih profila spojeva za svaki prehrambeni proizvod. Masne kiseline, trigliceridi, voskovi, steroli, ugljikovodici, alkoholi, tokoferoli i hlapljivi sastojci tvore profile karakteristične za podrijetlo hrane. Kromatografske tehnike koriste se za prepoznavanje autentičnosti namirnica, npr. za otkrivanje krivotvorenih visokokvalitetnih proizvoda s jeftinijim ili nekvalitetnim sastojcima. Neke od takvih namirnica su med, vino, povrće i maslinovo ulje, alkoholna pića, kava, mlijeko, sirevi, orašasti plodovi, gljive, itd.



Slika 4. GC-MS

Izvor: <http://www.foodqualitynews.com/Lab-Technology/Gas-chromatography-and-HRAM-Orbitrap-mass-spectrometry-combined> (datum pristupa 20. srpnja 2017.)

2.1.3. Izotopne tehnike

Izotopi su atomi istog elementa koji se međusobno razlikuju po masi. Izotopi nekog elementa imaju jednak broj elektrona i protona, ali različit broj neutrona što rezultira različitom masom. Stabilni izotopi odjeljuju se na temelju atomske mase na lake i teške izotope. Kod skupine lakih izotopa, uglavnom istraženi omjeri su $^2\text{H} / ^1\text{H}$, $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ i $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$, dok je omjer $^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$ manje uobičajen. Kod skupine teških izotopa, najčešće korišten omjer u provjeri autentičnosti hrane je $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ i nešto rjeđe $^{206}\text{Pb} / ^{204}\text{Pb}$, $^{207}\text{Pb} / ^{204}\text{Pb}$, $^{208}\text{Pb} / ^{204}\text{Pb}$, $^{143}\text{Nd} / ^{144}\text{Nd}$. Za analizu izotopnih omjera koriste se različite metode kao što je npr. Izotopna spektrometrija masa (IRMS, MC-ICP-MS ili TIMS). Instrument IRMS povezan s elementnim analizatorom, pirolizatorom, GC ili HPLC koriste se za određivanje omjera lakih izotopa, dok su teški izotopi mjereni pomoću MC-ICP-MS i TIMS. Omjer $^2\text{H} / ^1\text{H}$ je također analiziran i to posebno u malim molekulama kao što je etanol, koristeći NMR. Izotopni omjeri koriste se u provjeri autentičnosti hrane zbog toga što se omjeri izotopa mijenjaju obzirom na klimatske uvjete, zemljopisna podrijetla, i geologiju lokacije podrijetla sastojaka hrane.

Službene metode EU, OIV, CEN i AOAC od 1990-ih prepoznaju analizu stabilnih izotopa bioenergetskih sustava, u svrhu detektiranja krivotvorenja vina, meda, voćnog soka ili javorovog sirupa s jeftinijim punilima kao što su voda ili šećerni sirup od kukuruza ili šećerne trske. Primjena izotopnih omjera kod autentifikacije hrane vidi se i kod razlikovanja CO_2 šampanjca proizvedenog prirodnim vrenjem i onog koji je nastao izravnom injekcijom industrijskog CO_2 na umjetan način.

Novije primjene analize višestrukog izotopnog omjera ($^2\text{H} / ^1\text{H}$ ili D / H , $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$, $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$) obuhvaćaju studije potvrde zemljopisnog podrijetla vina, maslinovog ulja, narančastog voća, meda, rajčice, mesa, mliječnih proizvoda, jaja, plodova mora te kave. Izotopni otisci prstiju značajno se koriste kao potvrda organski uzgojenih proizvoda. Isto tako, izotopni otisak prsta može se kombinirati s drugim indikatorima (npr. elementnom analizom, NMR i GC) kako bi se još više poboljšalo određivanje porijekla raznih prehrambenih proizvoda.¹



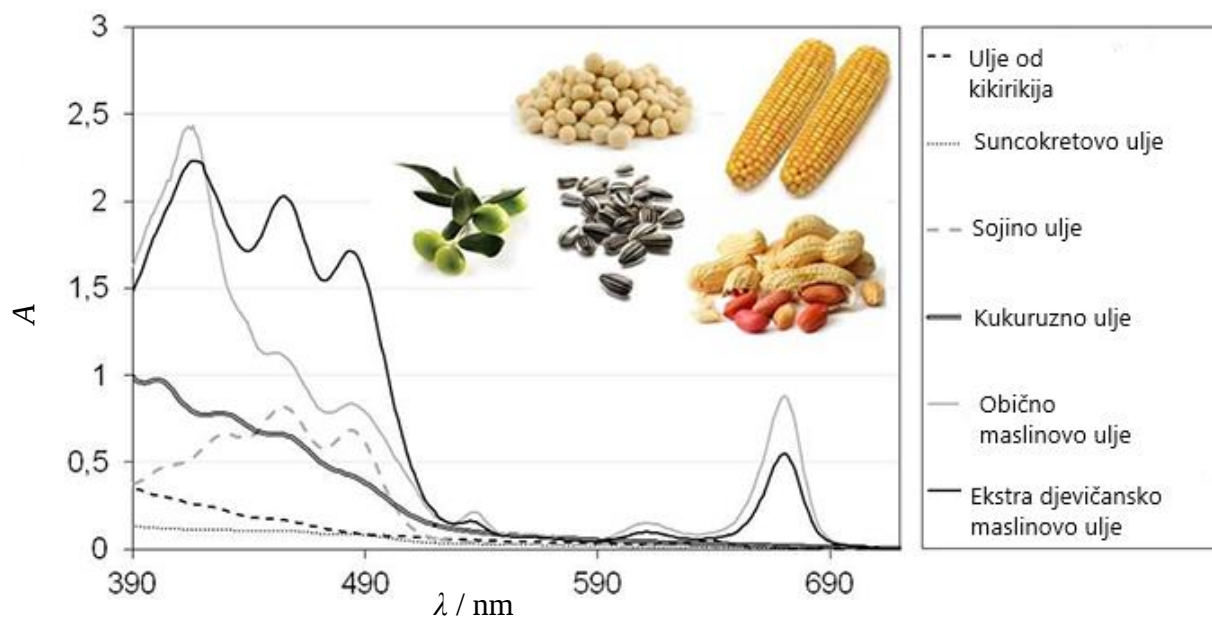
Slika 5. Izotopna analiza

Izvor: <http://originalp.eu/testmethoden/isotopen.html> (datum pristupa 20. srpnja 2017)

2.1.4. Vibracijska i flouescencijska spektroskopija

Najveću primjenu kao brza i jeftina metoda za procjenu kvalitete i autentičnosti hrane ima vibracijska spektroskopija. Novije instrumentalne tehnike u kombinaciji s kemometrijskim metodama omogućuju razvoj vrlo brzih metoda koje primjenjuju multivarijatnu analizu (MVA) i IR zračenje (NIR, MIR) za analizu nutritivnih i nenu nutritivnih komponenata hrane. U području infracrvenog zračenja (IR) kruti, tekući ili plinoviti uzorci mogu apsorbirati dio infracrvenog zračenja na određenim frekvencijama, stvarajući tako spektralni "otisak prsta" uzorka. MIR otisci prstiju rezultat su fundamentalnih istezanja, savijanja i rotacija vibracija molekula, dok su NIR spektri rezultat složenih kombinacija zvučnih i visokih frekvencija na kraćim valnim duljinama. Kvalitativna identifikacija uglavnom se vrši zbog visokih granica detekcije koje su predstavljene vibracijskim tehnikama, uglavnom Ramanom. Analitičke tehnike koriste Fourierovu transformaciju za infracrvenu (FT-IR) i Ramanovu (FT-Raman) fluorescenciju. Glavna prednost IR-a i Ramana je brza i nedestruktivna analiza uzoraka. SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), za razliku od Ramanove spektroskopije, osigurava niske granice detekcije za određene specifične molekule.

Fluorescentna spektroskopija je jednostavna, nedestruktivna i jeftina analitička tehnika. Molekule koje se najčešće detektiraju fluorescentnom spektroskopijom su poliaromatski ugljikovodici i heterocikli s krutim molekularnim kosturima. Analitički softveri omogućili su brza, pouzdana, ponovljiva mjerenja i razradu spektra. Stoga su razvijene mnoge fluorometrijske metode za provjeru autentičnosti, krivotvorenja, kvalitete i sastava hrane. Karakteristični primjeri spektroskopskih metoda upotrijebljenih za provjeru autentičnosti hrane uključuju krivotvorenje meda sirupima (visoki fruktozni kukuruz, maltoza) i otopinama šećera, krivotvorenje maslinovog ulja biljnim uljima, mljeveni papar miješanjem s heljdom i prosom, kulinarske začine krivotvorenjem s bojama i krivotvorenje mesa. Provode se identifikacije autentičnosti sljedećih prehrambenih proizvoda: mlijeka, maslinovog ulja, meda, vina, alkoholnih pića, začina i ostalih sastojaka hrane.¹



Slika 6. Krivotvorenje ekstra djevičanskog maslinovog ulja

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru: <https://www.intechopen.com/books/products-from-olive-tree/pigments-in-extra-virgin-olive-oil-authenticity-and-quality> (datum pristupa 1. kolovoza 2017)

2.1.5. Analitička elementna analiza

Analitička elementna analiza sve se više primjenjuje za procjenu autentičnosti hrane. Postoje makro-elementi (poput natrija, kalcija i kalija), elementi u tragovima (kao što su bakar, cink i selenij), elementi rijetkih zemalja (kao što su lantan, cerij i samarij) i drugi elementi (iridij i zlato). Gnojidba, berba, botaničko podrijetlo, vrsta tla, onečišćenje i proizvodna godina sve su faktori koji utječu na razlike u elementarnim koncentracijama. Međutim, te su varijacije manje od promatranja razlika između proizvodnih područja i geografskih regija. Elementi rijetkih zemalja imaju veliki potencijal za određivanje geografskog podrijetla, jer su njihovi otisci prstiju izravno povezani s geologijom nekog područja i mogu biti samo pod minimalnim utjecajem različitih poljoprivreda i godine berbe. Elementni sastav hrane životinjskog podrijetla donekle se odražava kroz vegetaciju koju životinje jedu. Otisak prsta nekog elementa kod hrane mjeri se nizom analitičkih tehnika. Iako su za to u prošlosti korištene tehnike atomske apsorpcije, danas se gotovo isključivo koriste spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) i atomske emisijske spektroskopije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES), jer imaju sposobnost za mjerenje više elemenata odjednom. Analitička elementna analiza koristi se za autentifikaciju hrane kod sljedećih prehrambenih proizvoda: vina, meda, maslinovog ulja, kave, sira, voća i povrća, začina i drugih dodataka hrani.^{1,5}



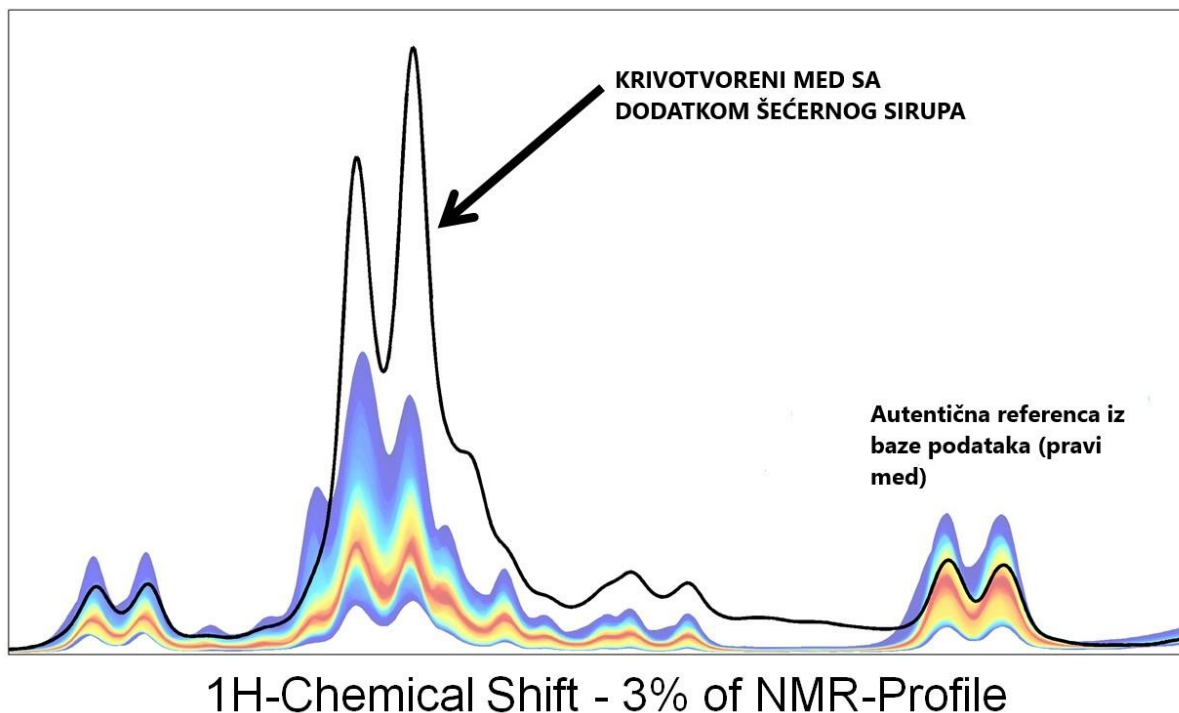
7. Analitička elementarna analiza

Izvor: <https://www.bruker.com/applications/food-agriculture/elemental-analysis-of-food.html> (datum pristupa 10. kolovoza 2017)

2.1.6. NMR

Prehrambeni proizvodi sadrže aminokiseline, masne kiseline i šećere. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) je jedna od najprikladnijih metoda za dobivanje spektroskopskih i strukturnih informacija o širokom rasponu molekularnih spojeva.

U prošlosti, osjetljivost metode NMR smatrala se njegovim glavnim ograničenjem, ali kontinuirani razvoj hardvera rezultirao je visokom osjetljivošću. Zbog toga se NMR može koristiti za provjeru autentičnosti hrane. Metoda SNIF-NMR primjenjuje se za određivanje geografskog podrijetla vina. To je 1990. godine razvila EU (EU propisi 2670/90, 2347/91 i 2348/91). Analiza ^1H -NMR koristi se za procjenu geografska podrijetla hrane. Analiza NMR je korištena za razotkrivanje krivotvorenja, kao što je npr. krivotvorenje crvenog vina s antocijanima, krivotvorenje sintetičkih aroma i prodavanje istih kao prirodnih, dodavanje šećerne trske ili kukuruznog šećera u javorov sirup. Sposobnost razlikovanja podrijetla/krivotvorenja koristeći NMR uključuje vino, kavu, maslinovo ulje, med, ribu, alkohol i ocat.¹



Slika 7. Primjer NMR spektra koji pokazuje krivotvorenje meda sa šećernim sirupom

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru:

<https://www.theresonance.com/category/application/food-science-safety/> (datum pristupa 11. kolovoza 2017)

2.1.7. Senzorna analiza

Potrošači sve više traže proizvode koji nisu samo sigurni sa dobrim hranjivim vrijednostima, već žele imati i visoku senzorsku kvalitetu prehrambenih proizvoda. Senzorna analiza postala je važna u mnogim prehrambenim sektorima. Da bi dobili pouzdane rezultate sa senzornom analizom potrebni su dobro obučeni, stručni kušači. Organoleptičko ocjenjivanje kvalitete obuhvaća niz tehnika za precizno mjerenje ljudske reakcije na određenu hranu. Izgled, aroma, okusi i tekstura važna su obilježja koja određuju autentičnost kvalitete prehrambenih proizvoda. To ocjenjivanje zahtijeva obuku kušača i detaljnu statističku analizu zapažanja. Senzorna procjena varira među kušačima zbog toga što su oni pojedinci s različitim osjetljivostima, preferencijama i znanjima o prehrambenom proizvodu. Procjena kušača može varirati s vremenom ovisno o njegovu umoru, stresu, zdravlju i drugim čimbenicima. Stoga se od kušača zahtijeva da imaju dobru osjetilnu percepciju, predanost i motivaciju. Također trebaju biti obučeni za korištenje standardiziranih i sustavnih senzorskih metoda kako bi dobili pouzdane rezultate.

Međutim, čak i ako su savršeno obučeni, još uvijek postoji potreba za standardizacijom senzorske analize kušača. To je moguće uz razvoj instrumentalnih tehnika koje bi objektivno i brzo prepoznale specifične senzorske percepcije na isti način kao i stručni kušači. U zadnje vrijeme sve više pozornosti privlače testovi za kvalitetu hrane koji koriste instrumente sa sensorima percepcije koji zamjenjuju testiranja na ljudima.

Senzorna analiza se može koristiti za utvrđivanje autentičnosti hrane kod vina, maslinovog ulja, čajeva, piva te sireva.^{1,6}



Slika 8. Senzorna analiza

Izvor: <https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/en/home/topics/food/sensory-analysis.html> (datum pristupa 11. kolovoza 2017)

2.1.8. Spektrometrija masa

Još treba spomenuti i tehnike spektrometrije masa (MS). Nedavne metode MS uključuju upotrebu samostalnih tehnika za elementarno ili molekularno profiliranje i snimanje. Među učinkovitije metode provjere autentičnosti hrane spadaju: PTR-MS (Proton transfer reaction mass spectrometry), MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) te DART-MS (Ambient Mass Spectrometry techniques such as Direct Analysis in Real Time).

Tehnika PTR-MS omogućuje kvantitativno on-line praćenje hlapivih organskih spojeva (VOC) primjenom metode mekane kemijske ionizacije za ionizaciju organskih molekula.

Hlapive VOC molekule reagiraju s nabijenim ionima. U većini slučajeva reagiraju sa H_3O^+ ionima. Tada H_3O^+ ioni prenose svoj proton specifično na VOC molekule koje imaju afinitet za protone veći od vode. Zatim, električno polje ubrzava ione kroz reakcijsku komoru i to dovodi do disocijacije iona koji se sudare.

Nakon skeniranja raspona masa dobiveni su otisci prstiju hlapivih spojeva. Stoga, PTR-MS trenutno daje apsolutne koncentracije VOC molekula. PTR-MS omogućuje brzu detekciju raznih organskih vrsta, kao što su alkeni, alkoholi, aldehidi, aromati, ketoni, nitrili i sulfidi, u složenim matricama s vrlo niskim granicama detekcije. Danas se koristi PTR-TOF-MS, koja je pronašla značajne primjene kod autentifikacije hrane.

Tehnika MALDI je pokazala veliki potencijal u brzim analizama probira kvalitete, sigurnosti i autentifikacije hrane jer kromatografska separacija obično nije potrebna. Uzorak se priprema tako da se slaba organska kiselina, pomiješa se s uzorkom i rezultirajuća otopina se nanosi na mikrotitarsku ploču te pusti da iskristalizira.

Zatim se ploča učita u spektrometru masa, a laserska zraka pogađa mjesto gdje su prisutni kristali matrice i analita. Zbog laserske energije, dio matrice, koji snažno apsorbira lasersku valnu duljinu, isparava zajedno s analitom i onda se širi velikom brzinom. Uzorci nastali u izvoru iona se ekstrahiraju i ubrzavaju u električnom polju visokim naponom. Nakon prolaska kroz polje ioni moraju proći kroz TOF analizator mase. Na kraju, ioni dolaze do detektora gdje

se ostvaruje pretvorba i pojačanje struje iona u električan signal. Tehnika MALDI-MS zahtijeva vrlo malu količinu uzorka. Danas postoje razni različiti mehanizmi desorpcije i ionizacije. Većina vrsta molekula s velikim rasponom masa i polariteta mogu se ionizirati vrlo jednostavno i s velikom lakoćom specifičnom kombinacijom brzine, selektivnosti i osjetljivosti detekcije koje posjeduje MS. Izravna analiza u stvarnom vremenu uz spektrometriju masa (DART-MS) jedna je od varijanti spektroskopije okolne mase. To je postala tehnika koja se koristi za brzu analizu masenog spektra velikog broja uzoraka. Proces ionizacije u tehnici DART-MS se odvija pri atmosferskom tlaku i traje samo nekoliko sekundi. Električni potencijal se spoji na plin s visokim ionizacijskim potencijalom (dušikom ili helijem) kako bi se formirala plazma atoma i iona pobuđenih stanja, a molekule male molekulske mase dolaze na površinu uzorka. To je pogodno za brzu analizu, bez uzimanja uzoraka ili uz uzimanje vrlo malo uzorka.

Tehnike MS primijenjene su kod provjere autentičnosti hrane kako bi se otkrile neispravne deklaracije i pogrešno označena hrana s određenom geografskom oznakom; tartufi, med, pivo, maslinovo ulje, sokovi. Ove tehnike se također koriste za sprečavanje prijevara hranom kao što je razrjeđivanje maslinovog ulja s jeftinijim biljnim uljima i krivotvorenje mlijeka ovaca i koza s mlijekom niže vrijednosti (kravlje mlijeko), krivotvorenje svježeg kravljeg mlijeka s mlijekom u prahu, krivotvorenje kave i stočne hrane.¹



Slika 9. DART-MS

Izvor: <http://rabi-musah.squarespace.com/news/2016/2/13/professor-musah-receives-a-grant-from-the-national-science-foundation-for-acquisition-of-a-direct-analysis-in-real-time-time-of-flight-high-resolution-mass-spectrometer> (datum pristupa 13. kolovoza 2017)

2.1.9. Imunološke tehnike

Imunoanaliza je koristan analitički alat koji se oslanja na specifičnu interakciju između protutijela i njihovih srodnih antigena. Oni su izvorno razvijeni kako bi olakšali proučavanje imunologije, ali su sada našli široku primjenu u mnogim drugim područjima, jer se mogu koristiti za otkrivanje mnoštva molekula; od proteina do malih organskih molekula u uzorcima prisutnim u prehrambenim proizvodima. Imunoanalize su postale popularni alati za profiliranje standarda različitih vrsta hrane i sastojaka hrane jer su brze, osjetljive, vrlo specifične i jeftine. Osim toga, imunoanalize su visoko propusne te podložne testiranju na terenu.

U prehrambenoj industriji antitijela su razvijena za specifične antigene kao što su npr. alergeni, toksini, patogeni, itd. Antitijela se zatim se koriste kao 'molekule za hvatanje' da bi uhvatile

ciljane antigene. Upravo zbog toga je proizvodnja specifičnih antitijela prvi ključni korak u razvoju imunoanalize. Veliki korak koji je otvorio vrata za opću uporabu imunotestova bio je razvoj enzimskih oznaka. Enzimski povezani imunosorbentni test, ELISA najčešće se koristi kod imunoloških tehnika. Elisa se koristi za provjeru autentičnosti nekoliko prehrambenih proizvoda kao što su meso, riba i mliječni proizvodi.

Također, može otkriti prisutnost genetski modificiranih organizama (GMO-a). Procjena autentičnosti hrane imunološkim tehnikama obuhvaća određivanje osteokalcina u mesu i kostima, otkrivanje melamina i goveđeg IgG-a u mlijeku te otkrivanje svinjskog mesa u mljevenom mesu junetine te proteina soje u mesnim proizvodima.¹



Slika 10. Testiranje mesa

Izvor: <https://www.thermofisher.com/blog/food/molecular-testing-and-food-safety-faqs/> (datum pristupa 13. kolovoza 2017)

2.1.10. Kemometrika i bioinformatika

Kemometrijski i bioinformatički alati od temeljne su važnosti za proučavanje autentičnosti hrane zbog toga što se moraju obrađivati velike količine podataka. Dijeljenje podataka, spajanje podataka i odabir značajki ključni su za izradu ogromnog seta podataka koji se generiraju kroz različite analitičke metode. Informatička infrastruktura kod područja provjere autentičnosti hrane je tek u ranoj fazi razvoja, a ona je ključna za sustavnu, sveobuhvatnu i široko primjenjivu procjenu autentičnosti hrane. Autentikacija hrane susreće se i bavi mnogim izazovima.

Jedan od izazova je to što ne postoje standardne smjernice za upute tijekom rada, tako da postupak eksperimenata i izvješćivanje o rezultatima u suštini pokazuju veliku raznolikost, a naša je sposobnost usporedbe rezultata sličnih studija vrlo ograničena. Većina izvješća ima ograničen opis studija i to ograničava njegovu vrijednost. Primjer dobro osmišljenog studija s opsežnim opisom je npr. usporedba kaveznog, podnog i ekološkog uzgoja jaja kokoši.

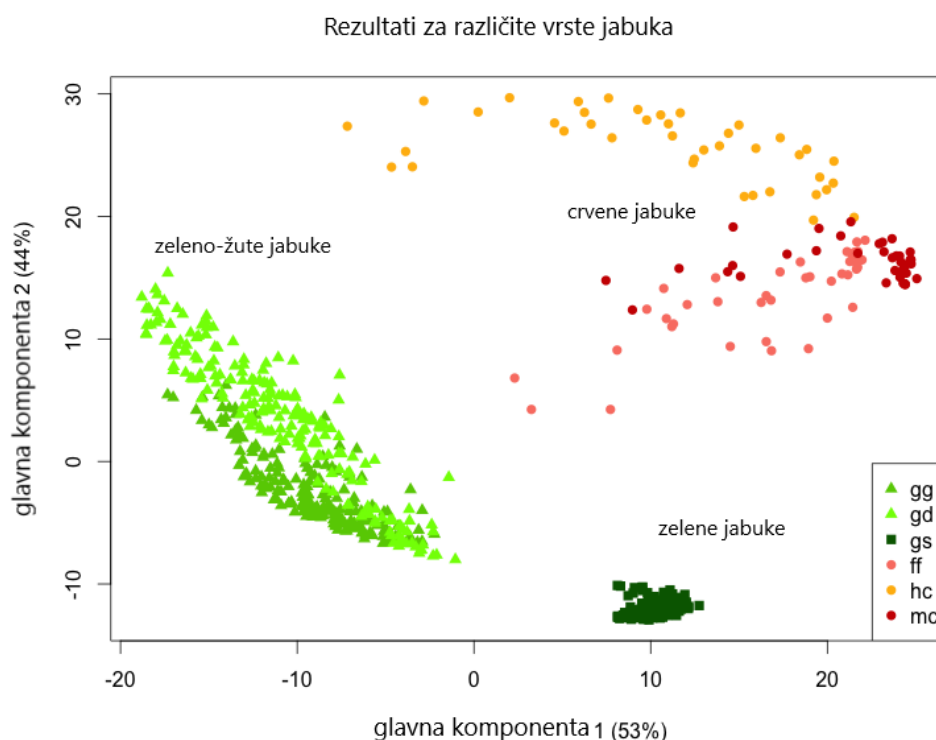
U toj studiji, prikupljeni podaci su se podudarali između sve tri različite metode proizvodnje, vrste kokoši, njihove prehrane i uvjeta uzgoja.

Mnoge studije pokazuju da uzorak hrane kupljen u supermarketu sadrži jako sažet opis na deklaraciji. Iako se situacija u posljednjih nekoliko godina poboljšava, većina prijavljenih studija nema dovoljan broj uzoraka za značajnu analizu. Baza podataka referentnih materijala ne postoji, tako da objavljeni rezultati ili pokazuju razdvojenost između klasa u podacima

(poput organskih ili neorganskih), ili jednostavno izvještavaju podatke, kao što je srednja vrijednost promatranih elemenata u tragovima. Autentifikacija hrane uključuje tehničke, strukturne i pravne probleme.

Metode i rezultati moraju dati ispravnu interpretaciju podataka što se uglavnom postiže korištenjem standardnih certificiranih referentnih materijala kako bi se osigurala točnost mjerenja. Moraju biti robusni zbog prirodne varijabilnosti sadržaja uzorka, pogrešaka mjerenja, učinaka obrade, skladištenja i rukovanja uzoraka. Referentni materijali za ovaj korak ne postoje, a broj ispitivanih uzoraka obično je prenizak. Moraju biti međusobno usporedivi kod različitih istraživanja kako bi se osigurala smisljena usporedba s referencama baze podataka.

Autentičnost hrane ovisit će kritički o uspostavi baze podataka koje sadrže sveobuhvatne i standardizirane informacije o porijeklu namirnica, uključujući geografsko porijeklo, vrstu i podvrstu, metode proizvodnje i druge ključne informacije. Većina provedenih studija do sada su istraživačke prirode ili su vezane za klasifikaciju uzoraka, primjerice analiziraju preliminarne podatke i pokazuju da su podaci razdvojivi po razredima. Prediktivni modeli koji mogu mapirati nepoznat uzorak na već poznatu klasu ovise o postojanju referentnih uzoraka i odgovarajućih definiranih baza podataka. Iako se nastojalo bilježiti krivotvorenje sastojaka hrane i europska baza podataka DOOR navodi više od 1500 sastojaka hrane zaštićenog podrijetla odgovarajuća baza podataka za klasifikaciju nepoznatih uzoraka još uvijek nedostaje. Kemometrika je svakako potrebna za rješavanje problema provjere autentičnosti ili potvrde identiteta sastojaka hrane. Ona se mora kombinirati s bazom podataka i odgovarajućim matematičkim alatima kako bi se provela provjera autentičnosti hrane.

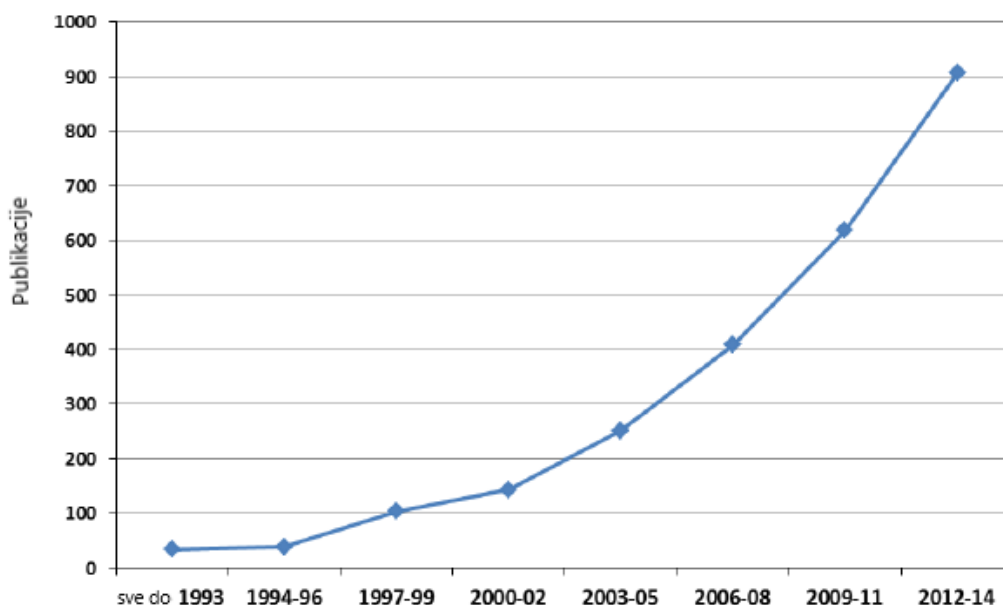


Slika 11. Primjer kemometrijske analize različitih tipova jabuka

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru: <https://oceanoptics.com/chemometric-analysis-of-food-quality/> (datum pristupa 14. kolovoza 2017)

2.2. Istraživački trendovi

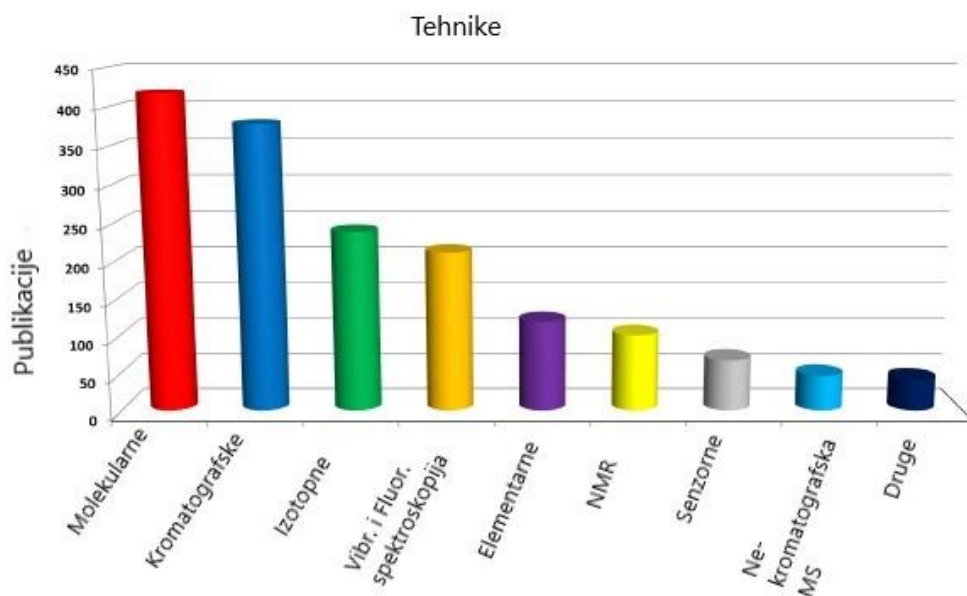
Više od 80% publikacija vezanih za autentifikaciju hrane su radovi objavljeni u istraživačkim časopisima, 7-8% čine recenzijski članci i konferencijski postupci, a 5% iznose poglavlja u knjigama ili cijele knjige. Određivanje zemljopisnog podrijetla, krivotvorenje, pogrešno označavanje deklaracija i sigurnost hrane glavni su aspekti kontrole hrane. Objavljeno istraživanje prikazano na slici 12 pokazuje da rast autentifikacije hrane nakon 2000. godine eksponencijalno raste.¹ Broj od 409 članaka objavljen je od 2006. do 2008, a 907 članaka je objavljeno u razdoblju 2012.-2014. godine.



Slika 12. Publikacije vezane za autentifikaciju hrane u ovisnosti o godini objave

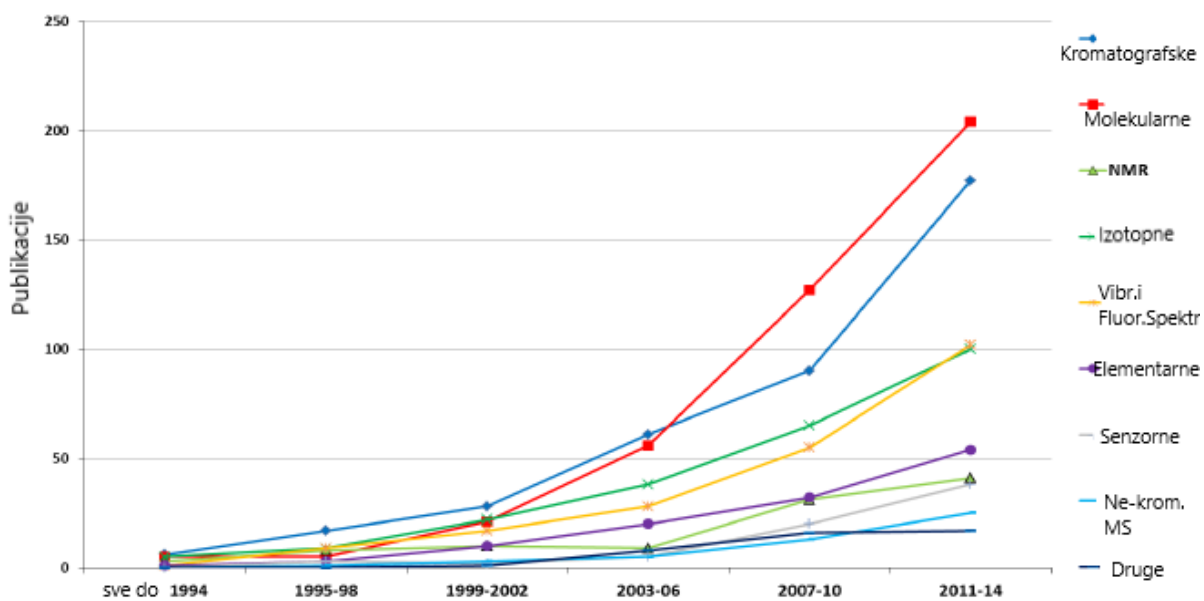
2.2.1. Analitičke tehnike koje se koriste za autentifikaciju hrane

Određivanje autentičnosti hrane obuhvaća niz verifikacijskih pristupa i provjera. Ovo poglavlje pruža uvid u analitičke tehnike za provjeru podrijetla naše hrane, u smislu regulatornih zahtjeva te zahtjeva od strane potrošača i industrije. Analitičke metode za određivanje geografskog podrijetla u velikoj se mjeri oslanjaju na određivanje kemijskog sastava koji može dati vrlo slične rezultate čak i kada isti materijal dolazi iz različitih geografskih područja. Temelje se na činjenici da su neke komponente tipične za određena geografska područja ili metode proizvodnje. Kada su različiti sojevi ili uzgajališta organizama uključeni u proces proizvodnje koriste se metode koje uključuju molekularne metode.



Slika 13. Publikacije vezane za autentifikaciju hrane u ovisnosti o korištenim analitičkim metodama

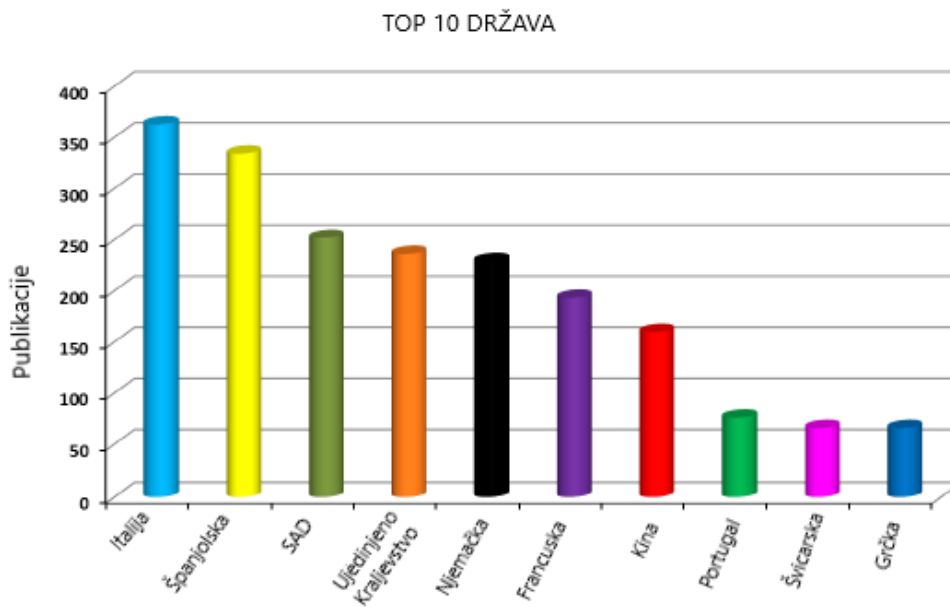
Kromatografske i molekularne metode su najčešće korištene analitičke metode kod autentifikacije hrane (slika 13). Ove dvije metode čine gotovo polovicu objavljenih publikacija. Iza njih slijede izotopne i vibracijske metode, UV i fluorescentna spektroskopija, elementarne analize te NMR. Neke druge metode kao što su MS, metoda otiska prsta i senzorska analiza nisu puno korištene. Metode koje su sve više popularne tijekom posljednje četiri godine su kromatografska, molekularna, vibracijska i fluorescencijska spektrometrija. (Slika 14).



Slika 14. Publikacije vezane za autentifikaciju hrane u ovisnosti o godini objave te korištenim analitičkim tehnikama

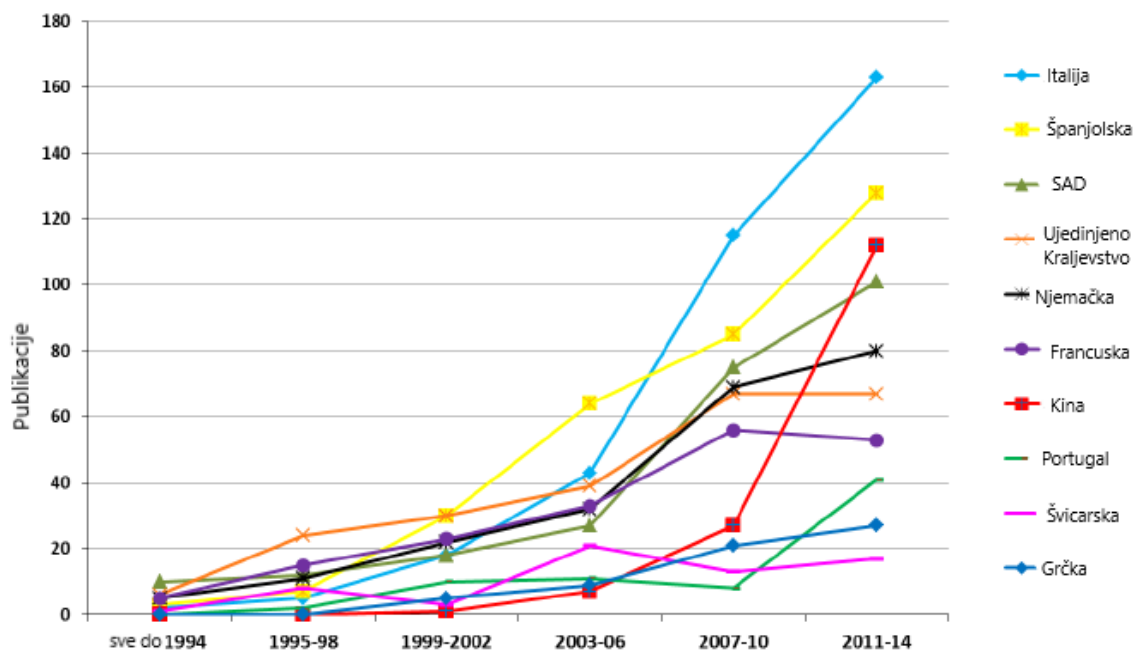
2.2.2. Istraživačka aktivnost po državama

Države jugoistočne Europe kao što su Italija, Španjolska, Francuska, Portugal i Grčka vrlo su uključene u studije vezane za provjeru autentičnosti hrane. To se može vidjeti na slici 15.



Slika 15. Top deset država s najviše publikacija o autentifikaciji hrane

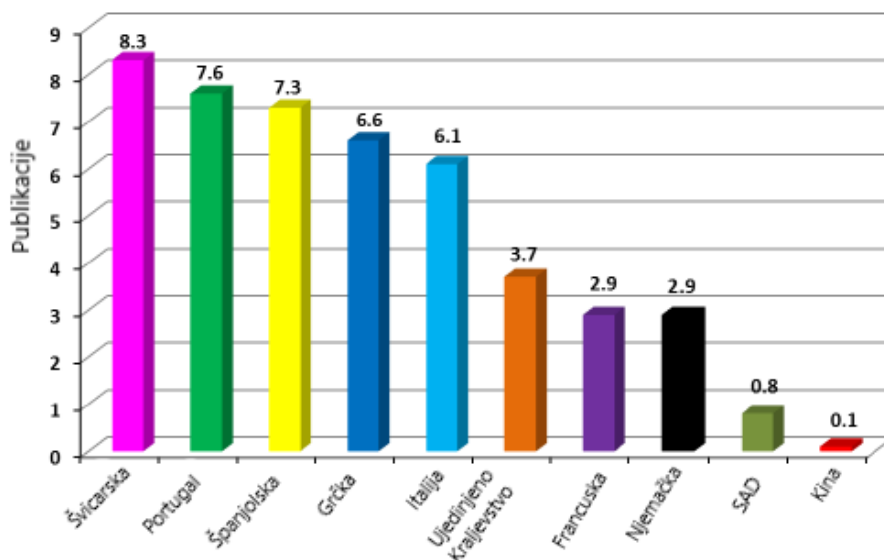
Te zemlje proizvode većinu prehrambenih proizvoda i vina registriranih kao PDO, PGI ili TSG. Za razliku od toga neke zemlje s visokom znanstvenom opremljenošću, sposobnostima i velikom proizvodnjom hrane, kao npr. SAD, ne uključuju se toliko u autentifikaciju hrane. Kina se sve više uključuje u to polje i pokazuje brz rast tijekom posljednjih 5 godina (Slika 16).



Slika 16. Vremenska evolucija istraživanja u različitim državama

Zanimljiva je činjenica da su sve države koje spadaju u prvih 10 europske, osim SAD-a i Kine. To ukazuje na povećani interes europskih država za autentifikaciju koju podupire i zakonodavstvo države i EU. Nadalje, zainteresiranost Europe za autentifikaciju hrane također se pokazuje kontinuiranim financiranjem s raznih strana.

Slika 5 prikazuje vremensku evoluciju istraživanja autentifikacije hrane po državama. Talijanski znanstvenici već su dugi niz godina aktivni na ovom području, a kineski se u zadnjih par godina snažno uključuju i pokazuju sve veću zainteresiranost što se tiče tog pitanja. To bi moglo biti povezano s velikim brojem talijanskih autentičnih prehrambenih proizvoda. Italija proizvodi više prehrambenih proizvoda nego bilo koja druga država. Moguće objašnjenje intenzivno rastućih aktivnosti u Kini moglo bi se pripisati rastu bruto domaćeg proizvoda po glavi stanovnika i interesu povezanim s kvalitetnim prehrambenim proizvodima kao što je npr. maslinovo ulje. Španjolska ima isto tako mnoge autentične prehrambene proizvode. Mjera koja pruža korisni uvid u napore istraživanja pojedinih zemalja u provjeri autentičnosti hrane je broj publikacija na temu po milijunu stanovnika i to je prikazano na slici 17.



Slika 17. Publikacije o autentifikaciji hrane po milijunu stanovnika 10 top država

Podaci prikazani na ovaj način normirani su s obzirom na veličinu zemlje. Europljani su opet najaktivniji, a iza njih slijede SAD i Kina. Jugoistočna Europe aktivnija je od država sjeverne Europe i to se pripisuje velikom broju visokokvalitetnih prehrambenih proizvoda koji su proizvedeni tamo. Zemlje sjeverne Europe imaju veliku biološku raznolikost i specifične klimatske značajke koje doprinose proizvodnji kvalitetne i autentične hrane. Primjetan je vodeći položaj Švicarske.

2.2.3. Znanstveni časopisi

Publikacije o autentičnosti hrane javljaju se u više od 150 časopisa. Radovi o provjeri autentifikacije hrane objavljuju se u raznim časopisima, iako se mogu vidjeti preferencije za pojedine časopise. Značajan obujam rukopisa koji čine dvadeset posto od ukupnog broja (Slika 7.) objavljeni su u časopisu 'Journal of Agricultural and Food Chemistry' i 'Food Chemistry'. To su dva najpriznatija časopisa vezana za hranu. Autentifikacija hrane pokazuje se kao bitna industrijska i znanstvena tema. Autentifikacija hrane temelji se na kemijskim analitičkim metodama i to pokazuje prisutnost visoko citiranih časopisa analitičke kemije kao što su 'Analytica Chimica Acta', 'Analitička i Bioanalitička kemija' i 'Časopis kromatografije A'. Bez obzira na sve to potreba za pouzdanijim i robusnijim novim analitičkim metodama koje bi se koristile za provjeru autentičnosti hrane veća je nego ikad.



Slika 7. Top 10 časopisa vezanih koji govore o autentifikaciji hrane¹

§ 3. ZAKLJUČAK

Analitički kemičari vode glavna istraživanja i razvijaju nove metode i tehnike za autentifikaciju hrane. No, treba naznačiti da je autentifikacija hrane multidisciplinarno područje u kojoj imaju svoju ulogu i druge grane kao što su biologija, informatika, matematika, statistika, poljoprivreda i prehrambena tehnologija. U ovom radu dan je pregled analitičkih metoda, informacijskih potreba te je dana aktualna znanstveno-metodička procjena polja. Molekularne spektroskopije pronalaze najveću uporabu kod određivanja vrste i botaničkog podrijetla, dok se sve ostale tehnike uglavnom bave geografskim podrijetlom i krivotvorenjem. Spektrometrija masa, tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihove mase i naboja, brzo zamjenjuje druge metode u mnogim područjima znanosti vezanih za hranu. Metoda MS je dobra za autentifikaciju hrane zbog toga što pokazuje visoku osjetljivost, selektivnost, propusnost i sposobnost multi-analize. Mogućnost višestrukih analiza bitna je za proučavanje autentičnosti hrane jer pruža bolju klasifikaciju. U zadnje vrijeme generiraju se sve veće količine analitičkih podataka, čije je upravljanje i analiza dijelom ograničena. U tu svrhu, razvoj različitih kemometrijskih i analitičkih tehnika ključan je za uspješan razvoj modela koji će poboljšati učinkovitost i konkurentnost sustava proizvodnje hrane i tehnologije za održivi hranidbeni lanac te promicanje sigurne hrane i zdravih prehrambenih navika.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. Georgios P. Danezis, Aristidis S. Tsagkaris, Federica Camin, Vladimir Brusic, Constantinos A. Georgiou, Food authentication: techniques, trends & emerging approaches, Trends in Analytical Chemistry (2016), <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.trac.2016.02.026>.)
2. <http://www.foodqualityandsafety.com/article/adressing-food-authenticity-challenges/> (datum pristupa 15. srpnja 2017)
3. <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/15/default.asp> (datum pristupa 29. srpnja 2017)
4. D. A. Skoog, D. M. West & F. J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 5th Edition, Saunders College Publishing, , NY, 1992, str. 645.
5. <https://www.bruker.com/applications/food-agriculture/elemental-analysis-of-food.html> (datum pristupa 1. kolovoza 2017)
6. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403215y> (datum pristupa 10. kolovoza 2017)