

Razvoj kolorimetrijskih analitičkih tehnika za karakterizaciju kvalitete mlijeka i ekološki pristup proizvodnji sira

Tomašić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:161866>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Ivan Tomašić

**Razvoj kolorimetrijskih analitičkih tehnika za
karakterizaciju kvalitete mlijeka i ekološki pristup
proizvodnji sira**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Ivan Tomašić

**Razvoj kolorimetrijskih analitičkih tehnika za
karakterizaciju kvalitete mlijeka i ekološki pristup
proizvodnji sira**

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni diplomski studij Kemija; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Analitička kemija

RAZVOJ KOLORIMETRIJSKIH ANALITIČKIH TEHNIKA ZA KARAKTERIZACIJU KVALITETE MLIJEKA I EKOLOŠKI PRISTUP PROIZVODNJI SIRA

IVAN TOMAŠIĆ

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada je razviti brzu, jednostavnu, ekonomski i ekološki prihvatljivu metodu koja se može primijeniti u industrijskim uvjetima, brzim pregledima na terenu ili u muznim uređajima, za određivanje kalcija u mlijeku kao primarnom proizvodu u proizvodnji sira. Mlijeko sadrži visoke koncentracije kalcija. Javlja se u dva oblika, slobodnom ionskom obliku i kalciju povezanom s mliječnim proteinima (kazeini), koji se još naziva i koloidni kalcijev fosfat. Odabrani su kolorimetrijska metoda i kolorimetrijski reagens, Arsenazo III koji se koristio u obliku natrijeve soli. Arsenazo III u reakciji sa kalcijem u otopini stvara obojenje od ružičaste do plave boje ovisno o koncentraciji kalcija. Kompleks koji stvara s kalcijem mora biti u prikladnom puferu. Kao kolorimetar se koristio pametni telefon. Kalcij se određivao u uzorcima mlijeka i filtrata mlijeka. Karakterizacija metode za izvedbu kolorimetrije izvedena je pomoću ugrađene kamere. Određeni kolorimetrijski uzorci obrađeni su i na spektrofotometru (Shimadzu UV-1700) kako bi se provjerila valjanost rezultata. Mjerenja boja koja se izvode izravno pomoću kamere pametnog telefona dobivaju se pomoću aplikacije RGB Detector (The programmer), preuzete s Google Play Store-a.

Ključne riječi: kalcij, Arsenazo III, mlijeko, pametni telefon

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Diplomski rad obuhvaća: 45 stranica, 19 slika, 14 tablica, 38 literaturnih navoda

Rad prihvaćen: 20. 9. 2024.

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Mateja Budetić

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Graduate study programme in Chemistry; Research program**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Analytical chemistry

DEVELOPMENT OF COLORIMETRIC ANALYTICAL TECHNIQUES FOR THE CHARACTERIZATION OF MILK QUALITY AND THE ECOLOGICAL APPROACH TO CHEESE PRODUCTION

IVAN TOMAŠIĆ

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: Aleksandar Sečenji, PhD, assistant professor

Abstract: The aim of this thesis is to develop a fast, simple, economically and ecologically acceptable method that can be applied in industrial conditions, rapid inspections in the field or in milking machines, for the determination of calcium in milk as a primary product in cheese production. Milk contains high concentrations of calcium. It occurs in two forms, free ionic form and calcium associated with milk proteins (caseins), which is also called colloidal calcium phosphate. A colorimetric method and a colorimetric dye, Arsenazo III, which was used in the form of a sodium salt, were chosen. Arsenazo III in the reaction with calcium in the solution creates a pink to blue color depending on the concentration of calcium. The complex it forms with calcium must be in a suitable buffer. A smartphone was used as a colorimeter. Calcium was determined in samples of milk and milk filtrate. The characterization of the colorimetry method was performed using a built-in camera. Certain colorimetric samples were also processed on a spectrophotometer (Shimadzu UV-1700) in order to check the validity of the results. Color measurements performed directly using the smartphone camera are obtained using the RGB Detector (The programmer) app, downloaded from the Google Play Store.

Keywords: *calcium, Arsenazo III, milk, smartphone*

Original language: Croatian language

Thesis includes: 45 pages, 19 pictures, 14 tables, 38 literature references

Thesis accepted: 20.9.2024

Reviewers:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. doc. dr. sc. Mateja Budetić

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Zahvala

Prije svega želim se zahvaliti svom mentoru doc. dr. sc. Aleksandru Sečenjiju, na ukazanom povjerenju, uloženom trudu, vremenu, na ugodnoj atmosferi i ohrabrivanju pri izradi ovog diplomskog rada, ali i pri izradi prijašnjeg završnog rada i ostatku studiranja.

Zahvaljujem se i cijelom ustroju Odjela za Kemiju koje me je podržalo u početku studiranja na preddiplomskom studiju. Zahvaljujem se profesorima na njihovoj spremnosti i lakoći organiziranja konzultacija, dostupnosti i volji na pomoći.

Želim se zahvaliti prijateljima i kolegama koji su bili uz mene pogotovo u stresnim situacijama, a posebno kolegici Rajni koja je uvijek ponudila svoje znanje i dragocjeno vrijeme.

Najveću zahvalu zaslužuju moji roditelji koji su me poticali i podržavali u svakom trenutku dugog studija, omogućili mi bavljenje sportom uz studij, te mi bili neiscrpan izvor savjeta.

Zahvaljujem se i sestri koja je svojim primjerom mene napravila boljim studentom.

Zahvaljujem se naravno i svojoj zaručnici na podršci i motivaciji pri završetku studijskog dijela života.

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Literaturni pregled.....	3
2.1.	Što je mlijeko	3
2.1.1.	Lipidi mlijeka	3
2.1.2.	Proteini mlijeka	4
2.1.3.	Suha tvar u mlijeku	5
2.1.4.	Bioraspoloživost kalcija	5
2.2.	Utjecaj kalcija na kvalitetu sira	6
2.3.	Metode određivanja kalcija u mlijeku	7
2.3.1.	Atomska apsorpcijska spektroskopija	7
2.3.2.	Induktivno spregnuta plazma masena spektrometrija	8
2.3.3.	Spektroskopija optičke emisije induktivno spregnute plazme	9
2.3.4.	Potencijometrija.....	10
2.3.5.	Kompleksometrijska titracija (EDTA titracija).....	10
2.3.6.	Kolorimetrijske metode.....	11
2.3.7.	Arsenazo Reagensi	13
2.4.	Metoda standardne adicije.....	14
2.5.	Instrumentacija za kolorimetrijska mjerenja	15
2.6.	Spektrofotometri.....	15
2.7.	Beer-Lambertov zakon	16
2.8.	Primjena digitalne fotografije u svrhu određivanja promjene boje i intenziteta boje za kolorimetrijska mjerenja	17
2.9.	Pripreme uzoraka mlijeka za mjerenje kalcija	17
2.9.1.	Primjeri pripreme uzorka mlijeka za analizu Arsenazo III	17
2.9.2.	Pripreme uzorka za određivanja ukupnog kalcija	18
2.9.3.	Pripreme uzorka za određivanja slobodnog kalcija.....	18

3.	Ekperimentalni dio.....	19
3.1.	Korišteni reagensi i kemikalije.....	19
3.2.	Korišteni uređaji i instrumenti.....	19
3.3.	Priprema otopina reagensa i standarda.....	20
3.4.	Optimizacija Arsenazo III metode za određivanje koncentracije kalcija u mlijeku	21
3.4.1.	Priprema otopina za određivanje optimalnog omjera koncentracije Arsenazo III i Ca^{2+} iona.....	21
3.4.2.	Određivanje optimalne koncentracije Arsenazo III za određivanje koncentracije kalcija u mlijeku	22
3.4.2.1.	Seriya B $c_{(\text{Arsenazo III})} = 15 \mu\text{M}$	22
3.4.2.2.	Seriya E $c_{(\text{Arsenazo III})} = 30 \mu\text{M}$	23
3.4.2.3.	Seriya H $c_{(\text{Arsenazo III})} = 50 \mu\text{M}$	24
3.5.	Određivanja koncentracije kalcija u uzorcima mlijeka	25
3.5.1.	Mjerenje koncentracije Ca^{2+} u mlijeku	25
3.5.2.	Mjerenje koncentracije Ca^{2+} u filtratu mlijeka.....	25
3.6.	Određivanje optimalnih parametara za digitalne fotografije i mjerenje promjene boje uzoraka	26
4.	Rezultati i rasprava.....	27
4.1.	Određivanje optimalnog omjera koncentracije Arsenazo III i Ca^{2+} iona.....	27
4.2.	Određivanje ukupne koncentracije Ca^{2+} iona u uzorcima homogeniziranog mlijeka	37
4.3.	Određivanje koncentracije slobodnih Ca^{2+} iona u uzorcima homogeniziranog mlijeka.....	39
5.	Zaključak.....	41
6.	Literatura	42

1. Uvod

Kalcij je važan mineral u ljudskim kostima. U zapadnim zemljama poput Hrvatske 45 – 70 % kalcija u prehrani dobiva se iz mliječnih proizvoda, stoga je prerađivačima mlijeka važno da mogu kvantificirati količinu kalcija u mliječnim proizvodima, pogotovo jer potrošači prepoznaju potrebu za kalcijem za održavanje zdravlja kostiju [1]. Industrijsko okruženje također zahtijeva ekonomičnu, industrijski održivu i brzu metodu, tako da se odluke mogu donositi na licu mjesta. Kalcij u mlijeku postoji u dva glavna oblika. Otprilike 66 % prisutno je kao koloidni kalcijev fosfat (CCP), gdje je kalcijev ion ionski vezan za fosfat koji je pak kovalentno vezan za kazeine na nizu serinskih ostataka. Ostalih 34 % je prisutno kao slobodni kalcijev ion, ionski uravnotežen s fosfatom, kloridom, karbonatom, bikarbonatom, sulfatom i citratom [2]. Međutim, udio kalcija kao CCP i slobodnih iona varira od omjera 2:1 kako se mijenjaju ukupna koncentracija kalcija u mlijeku, temperatura, ionska jakost, pH i porijeklo mlijeka (prehrana, pasmina krava, doba godine) [2]. Različite metode prerade mlijeka poput ultrafiltracije (UF) mlijeka, proizvodnje jogurta i sira mogu utjecati na količinu kalcija u konačnom proizvodu. UF se koristi kao sredstvo za povećanje kalcija u mlijeku koncentriranjem proteina, dakle vezanog kalcija. Isto tako i koncentracija kalcija utječe na kakvoću mliječnih proizvoda, i važan je tehnološki parametar u preradi mlijeka. U svakom slučaju, određivanje koncentracije različitih oblika kalcija u mliječnim proizvodima ima veliku važnost. Problemi proizvodnje mlijeka i mliječne industrije u Republici Hrvatskoj poznati su i široj javnosti. Ministarstvo Poljoprivrede Republike Hrvatske izradilo je program razvoja sektora mljekarstva s akcijskim planom i smjernicama do 2030. godine. Jedan od prioriteta je razvoj domaće ponude i prerade mlijeka i mliječnih proizvoda (kratki lanci opskrbe), time se osigurava malim obiteljskim gospodarstvima da na ekonomski i ekološki prihvatljiv način uspješno stupe na tržište mliječnih proizvoda. Glavni proizvod takvih gospodarstava je sir na čija svojstva utječu koncentracije slobodnog kalcija i CCP, stoga su predmetni podaci posebno potrebni za osiguranje kvalitete u proizvodnji domaćeg sira.

Cilj ovog diplomskog rada je proučiti metode za određivanje koncentracije vezanog i nevezanog kalcija u mlijeku, te na temelju proučenog razviti novu jednostavnu metodu za njihovo mjerenje u malim obiteljskim siranama. Sveprisutna upotreba pametnih telefona i njihova tehnička svojstva potaknula su korištenje istih kao platforme za kemijske analize. Najjednostavnije je koristiti digitalne kamere pametnih telefona za kvantifikaciju promjene boje ili intenziteta boje. To su dva parametra na kojima se zasnivaju mnogobrojne analitičke

metode među kojima je i kolorimetrija. Postoji nekoliko prednosti upotrebe pametnog telefona kao kolorimetra u odnosu na dedicerane kolorimetrijske uređaje kao što su:

- pametni telefoni su mali, lagani prijenosni uređaji koji se mogu lako nositi za rad na terenu ili vanjska mjerenja,
- njihova niska cijena i višenamjenska upotreba čine ih ekonomski opravdanim a pa kolorimetriju čine dostupnom širem krugu korisnika koji možda nemaju proračun za specijaliziranu opremu,
- visokokvalitetna kamera koja može snimati slike visoke razlučivosti i dobre točnosti boja čini ih prikladnima za snimanje i analizu vrijednosti boja, posebno za aplikacije u kojima je potrebna visoka razina detalja,
- pametni telefoni su jednostavni za korištenje i većina korisnika već intuitivno zna kako njima rukovati,
- integracija s drugim značajkama kao što su internetska povezivost, GPS i snimanje glasa. Ove opcije mogu se lako integrirati s kolorimetrijskim mjerenjima, na primjer, za automatsko spremanje podataka o lokaciji sa svakim mjerenjem ili za snimanje glasovnih bilješki ili slika uz rezultate.

Preciznija kolorimetrijska mjerenja mogu se postići dodavanjem disperzivne rešetke ispred kamere dok se kamera pametnog telefona koristi kao detektor. Nedavno je nekoliko preglednih radova pokazalo stanje tehnike kolorimetara temeljenih na pametnim telefonima koji se koriste kao opći spektrofotometar modificiran za očitavanje biosenzora za zdravstvenu njegu [3] ili za praćenje kvalitete i sigurnosti hrane [4] te za otkrivanje opasnih tvari [5]. Iako kolorimetrija putem pametnih telefona ima svoje prednosti, važno je napomenuti da točnost mjerenja neće biti tako visoka kao kod specijalizirane opreme. Cilj je dakle procijeniti u kojoj se mjeri pametni telefon kao kolorimetar može koristiti kao detektor kalcija u mlijeku. U tu svrhu odabrana je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na reakciji kalcija s kompleksometrijskim indikatorom Arsenazo III. Kolorimetar pametnog telefona bio je karakteriziran korištenjem ugrađene kamere kao detektora dok su uzorak osvjetljavala dva izvora svjetlosti topline boje 4 000 K. Kolorimetrijske koordinate plave i crvene svjetlosti dobivene pametnim telefonom uspoređene su s vrijednostima mjerenim spektrofotometrom (*Shimadzu UV-1700*) kako bi se procijenila točnost mjerenja.

2. Literaturni pregled

2.1. Što je mlijeko

Mlijeko je tekućina koju proizvode ženke sisavaca prvenstveno kako bi osigurale potpunu prehranu svojim potomcima [2]. U većini svijeta, goveđe mlijeko, poznatije kao kravlje mlijeko, čini gotovo sav udio mlijeka koji se koristi za prehrambenu industriju ljudi. U ovom radu sva istraživanja i rasprave odnose se na goveđe odnosno kravlje mlijeko. Mlijeko je dinamična i složena biološka tekućina. Sastoji se od komponenti u tri faze: prava otopina (laktoza, soli i vitamini), disperzirani proteini (proteini sirutke i kazeini) i emulgirani lipidi. Na stabilnost mlijeka utječu čimbenici kao što su temperatura, pH, enzimi i rast mikroba, koji mogu uzrokovati fizičke, enzimske ili mikrobiološke promjene tijekom skladištenja ili obrade.

Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 136/2020) kravlje mlijeko mora udovoljavati sljedećim zahtjevima kakvoće:

- sadržavati najmanje 3,0 %, a najviše 5,5 % mliječne masti,
- sadržavati najmanje 2,5 %, a najviše 4 % proteina,
- sadržavati najmanje 8,5 % suhe tvari bez masti,
- gustoća bi trebala biti 1,028 /cm³ na temperaturi od 20 °C,
- kiselinski stupanj bi trebao biti od 6,0 do 6,8 °SH, a pH vrijednost od 6,5 do 6,7,
- točka ledišta ne smije biti viša od -0,517 °C,
- rezultat alkoholne probe sa 72 % etilnim alkoholom mora biti negativan.

Sirovo mlijeko mora potjecati od muznih životinja koje su u periodu najviše 30 dana prije poroda ili su prošle više od osam dana nakon poroda. Također, sirovo mlijeko treba imati karakterističan izgled, boju, miris i okus.

2.1.1. Lipidi mlijeka

Sadržaj lipida i sastav goveđeg mlijeka su složeni i podliježu utjecaju bioloških mehanizama i okolišnih čimbenika, koji mogu značajno utjecati na hranjivu vrijednost mlijeka kao i na njegove karakteristike tijekom prerade. Triacilgliceroli čine 96 – 98 % lipida mlijeka, a postoje kao masne kuglice (2 – 6 µm u promjeru) okružene membranskim materijalom iz apikalne stanične membrane. Lipoliza tijekom skladištenja povećava slobodne masne kiseline i monoacilglicerole i diacilglicerole. Mlijeko sadrži preko 400 različitih masnih kiselina, što dovodi do potencijalnih 64 milijuna vrsta triacilglicerola, iako je vjerojatnih samo 455 sastava.

J. Gresti i suradnici [6] identificirali su 223 različita triacilglicerola koji čine 80 % ukupnog broja. Masne kiseline u triacilglicerolima su nenasumično raspoređene zbog specifičnosti enzima aciltransferaze. Dugolančane masne kiseline obično su na pozicijama sn-1 i sn-2, dok su kratkolančane masne kiseline tipično na sn-3. Na primjer, 85 % butirata i 58 % kaproata nalazi se na sn-3 [7]. Lipidi u mlijeku, posebice masne kiseline, pod velikim su utjecajem čimbenika iz okoliša, posebice prehrane. Omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina relativno je stabilan zbog biohidrogenacije buraga. Međutim, hranjenje zaštićenim ili nezasićenim masnim kiselinama (npr. inkapsuliranim u denaturiranom proteinu) može povećati njihovu ugradnju u mlijeko, što je poželjno za zdravstvene dobrobiti, ali može utjecati na oksidativnu stabilnost i okus. Fosfolipidi i kolesterol dio su membrane globule mliječne masti, a nastaju iz stanične membrane tijekom pinocitoze. Glavni fosfolipidi uključuju fosfatidilkolin (33,6 %), sfingomijelin (35,3 %) i fosfatidiletanolamin (22,3 %). Mlijeko sadrži relativno nisku koncentraciju kolesterola (10 mg po 100 mL), što je povezano s udjelom masti [8].

2.1.2. Proteini mlijeka

Mlijeko sadrži 30 – 36 g/L ukupnih bjelančevina, koje imaju visoku nutritivnu kvalitetu. Glavni proteini u mlijeku su proizvodi šest ključnih gena: α 1-kazein, α 2-kazein, β -kazein, κ -kazein, β -laktoglobulin i α -laktalbumin. Ovi proteini pokazuju genetski polimorfizam, što znači da variraju zbog različitih alela autosomnih gena. Mliječni proteini se dijele na kazeine i proteine sirutke. Kazeini predstavljaju 80 % ukupnih proteina u kravljem mlijeku te tvore micelle, koje su sferni, visoko hidratizirani kompleksi s kalcijevim fosfatom. Promjer ovih micela je od 30 do 300 nm. Tipična micela kazeina sadrži tisuće molekula kazeina, od kojih većina tvori termodinamički stabilne komplekse s nanoklasterima amorfnog kalcijevog fosfata [9]. Tijekom proizvodnje sira dolazi do agregacije micela kazeina, tvoreći gruše, dok proteini sirutke ostaju u tekućoj sirutki. Proteini sirutke uključuju β -laktoglobulin i α -laktalbumin (proizvedeni u mliječnoj žlijezdi), kao i serumski albumin i imunoglobuline (iz krvi). Proteini sirutke su nekoć bili odbačeni, ali sada se smatraju vrijednima zbog svojih nutritivnih i funkcionalnih svojstava u sirevima poput rikote. Mlijeko također sadrži polipeptide proizvedene posttranslacijskom proteolizom proteina pomoću plazmina, proteinaze iz krvi. Ovim procesom nastaju γ -kazeini i proteoza-peptoni, koji su fragmenti β -kazeina. Kazeini su bogati fosfoserilnim ostacima i prolinom, što doprinosi njihovim jedinstvenim svojstvima. Proteini sirutke sadrže više rezidua cisteina, koji utječu na njihovu strukturu i funkcionalnost.

2.1.3. Suha tvar u mlijeku

Mlijeko sadrži razne soli, uključujući kloride, fosfate, citrate i bikarbonate natrija, kalija, kalcija i magnezija. Ove soli uključuju i organske i anorganske vrste, a njihov sastav se razlikuje od sadržaja "pepela", koji nastaje izgaranjem minerala. Mliječne soli su u obliku iona koji se mogu ultrafiltrirati i ionskih kompleksa te većih koloidnih čestica koje doprinose strukturi kazeinskih micela. Soli koje se mogu ultrafiltrirati su mali ioni i kompleksi, mogu se izolirati dijalizom ili ultrafiltracijom, što dovodi do razvoja "simuliranog ultrafiltrata soli mlijeka", koji se obično koristi u istraživanju mlijeka [10, 11]. Većina kalcija (Ca^{2+}) i magnezija (Mg^{2+}) su u kompleksu (npr. kao Ca-citrat ili Mg-citrat), a samo 20 – 30 % postoji kao slobodni ioni. Ioni natrija (Na^+), kalija (K^+) i klorida (Cl^-) uglavnom postoje kao slobodni ioni. Koncentracija tih tvari može se koristiti kao parametar zdravlja krave [12]. Koloidne soli se vežu za mliječne bjelančevine, posebno u kazeinskim micelama, utječući na stabilnost i funkcionalnost mliječnih bjelančevina, posljedično, na svojstva mliječnih proizvoda. Postoji obrnuti odnos između mliječnih soli i laktoze, čime se osigurava dosljedna točka smrzavanja. Ovo svojstvo pomaže u otkrivanju krivotvorenja mlijeka. Laktoza je primarni ugljikohidrat u mlijeku te čini 50 % krutih tvari u obranom mlijeku. Njena sinteza usko je povezana s α -laktalbuminom, proteinom sirutke koji modificira aktivnost enzima za proizvodnju laktoze. Laktoza postoji u dva oblika (α i β), s tim da je β oblik bolje topiv. Kristalizacija α oblika može uzrokovati "brašnastu" teksturu u mliječnim proizvodima poput sladoleda. Laktoza ima otprilike jednu petinu slatkoće od saharoze i doprinosi karakterističnom okusu mlijeka.

2.1.4. Bioraspoloživost kalcija

Bioraspoloživost hranjivih tvari odnosi se na maksimalnu količinu određene hranjive tvari koju tijelo apsorbira i iskorištava, pri čemu na nju utječu čimbenici kao što su spol, fiziološko stanje i postojeći zdravstveni problemi. Nekoliko čimbenika utječe na bioraspoloživost nutrijenata, uključujući njihov kemijski oblik, sastav hrane ili dodatka s kojima se konzumiraju te druge namirnice u prehrani [13]. Apsorpcija kalcija prvenstveno se događa u gornjem dijelu tankog crijeva, gdje blago kisela okolina pomaže u održavanju kalcija u njegovom ionskom obliku koji se može apsorbirati (Ca^{2+}). Aktivni vitamin D ($1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D) pospješuje apsorpciju kalcija u ovoj regiji. Odrasli obično apsorbiraju 25 – 30 % kalcija iz hrane, ali stope apsorpcije mogu porasti na 75 % tijekom razdoblja velike potražnje, kao što su rast, trudnoća ili djetinjstvo [14, 15]. Čimbenici koji pospješuju apsorpciju uključuju unos kalcija hranom, laktozu i proteine. Međutim, apsorpcija kalcija opada s godinama, osobito nakon 70. godine života, a najmanja je u žena u postmenopauzi [16]. Inhibitori apsorpcije kalcija uključuju fitinsku

kiselinu, oksalnu kiselinu, visok unos fosfora, polifenole u čaju, nedostatak vitamina D i određene probavne smetnje. Nakon što se apsorbira, kalcij se prenosi krvlju ili kao slobodni ionizirani kalcij ili vezan za proteine. Više od 99 % kalcija u tijelu pohranjeno je u kostima i zubima, ali sve stanice trebaju kalcij. Razine kalcija u krvi strogo reguliraju hormoni poput paratiroidnog hormona (PTH) i kalcitonina. PTH povećava kalcij u krvi pojačavanjem reapsorpcije u bubrezima, promicanjem sinteze vitamina D i otpuštanjem kalcija iz kostiju. Kada razina kalcija poraste, lučenje PTH se smanjuje, smanjujući apsorpciju kalcija i povećavajući izlučivanje mokraćom, dok kalcitonin sprječava gubitak kalcija iz kostiju. Kalcij se također izlučuje putem urina, kože i stolice [17].

2.2. Utjecaj kalcija na kvalitetu sira

Kalcij igra ključnu ulogu u proizvodnji sira, posebice u utjecaju na njegovu teksturu, strukturu i ukupnu kvalitetu. Sirevi s dužim vremenom zrenja uglavnom imaju veću koncentraciju kalcija [18]. Tijekom procesa proizvodnje sira, kalcij je uključen u stvaranje kazeinske matrice koja je neophodna za razvoj strukture i čvrstoće sira. U tvrdim sirevima kao što je Cheddar, kalcij se veže na kazeinske proteine, stvarajući mrežu koja hvata mast i vodu, pridonoseći karakterističnoj teksturi sira. Dodavanje CaCl_2 tijekom koraka soljenja u proizvodnji sira može značajno utjecati na sastav i teksturu sira. Više razine kalcija u siru rezultiraju čvršćom teksturom zbog stvaranja čvršće proteinske matrice. Ova povećana čvrstoća posljedica je poboljšane interakcije između kalcija i kazeina, što dovodi do smanjenja sadržaja vlage i povećanja koncentracije proteina u odnosu na masnoću. Prisutnost više koloidnog kalcija u matrici sira stabilizira ovu strukturu, čineći sir tvrdim [19]. Kalcij utječe na proces zrenja sira. Sirevi s višim razinama kalcija pokazali su manju proteolitičku aktivnost i sporiji porast količine dušika topljivog u vodi tijekom zrenja. To ukazuje da kalcij smanjuje aktivnost enzima odgovornih za razgradnju bjelančevina, čime se usporava proces zrenja i održava čvrstoća sira dulje vrijeme [19]. Dodatno, kalcij utječe i na mikrostrukturu sira. Kako se razina kalcija povećava, proteinski matriks postaje kompaktniji, a masne kuglice se skupljaju u veće i nepravilne oblike. Ova čvršća struktura manje je sklona deformacijama te utječe na okus sira u ustima i svojstva rezanja. Kod mekših sireva poput Mozzarelle, ubrizgavanje otopine CaCl_2 smanjuje sadržaj vlage i pH u siru, što rezultira povećanom tvrdoćom, smanjenom kohezivnošću i lošijim svojstvom taljenja. Smanjenje vlage i strukturne promjene rezultat su pojačane interakcije između proteina, što dovodi do čvršće proteinske matrice i oslobađanja seruma iz sira [20]. Ubrizgavanje otopine CaCl_2 u blokove mozzarelle rezultiralo je mikrostrukturnim promjenama, smanjenjem površine koju zauzima proteinska matrica u siru.

Ova promjena u strukturi, uzrokovana interakcijom kalcija s proteinima kazeina, objašnjava povećanu tvrdoću sira i smanjenu sposobnost topljenja, a te promjene utječu na njegovu prikladnost za određene primjene poput pizze ili drugih jela koja zahtijevaju dobru topljivost [20].

2.3. Metode određivanja kalcija u mlijeku

2.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) (engl. *atomic absorption spectroscopy*) je analitička tehnika koja se koristi za određivanje koncentracije specifičnih elemenata, kao što je kalcij, u raznim uzorcima, uključujući mlijeko. Tehnika se temelji na načelu slobodnih atoma koji u osnovnom stanju mogu apsorbirati svjetlost određene valne duljine. U slučaju kalcija, ova se apsorpcija događa na valnoj duljini od 422,7 nm. Uzorak mlijeka obično se priprema digestijom ili razrjeđivanjem kako bi se razgradio matriks i oslobodili ioni kalcija. Uobičajena metoda uključuje korištenje kiselina poput HNO_3 za digestiju uzorka, čime se osigurava da je kalcij u slobodnom ionskom obliku, pogodan za analizu. Pripremljeni uzorak se zatim razrijedi do odgovarajuće koncentracije za mjerenje, obično deioniziranom vodom ili drugim prikladnim otapalom. Kod AAS-a pripremljeni uzorak se unosi u instrument kroz raspršivač, koji tekući uzorak pretvara u finu maglicu ili aerosol. Ovaj aerosol se zatim prenosi u plamen ili grafitnu peć. Postoje dvije vrste AAS-a, plamena AAS i AAS s grafitnom peći. Kod plamene AAS aerosol se uvodi u plamen, obično potaknut mješavinom zraka/acetilena ili dušikovog oksida/acetilena. Visoka temperatura plamena (2 000 – 3 000 °C) isparava otapalo i atomizira ione kalcija, pretvarajući ih u slobodne atome kalcija. AAS s grafitnom peći nudi veću osjetljivost dopuštajući kontroliraniji i koncentriraniji proces atomizacije, te se uzorak unosi u grafitnu peć. Peć se zagrijava u fazama, suši, pretvara u pepeo i na kraju atomizira uzorak. Uobičajeno se kao izvor svjetlosti koristi šuplja katodna lampa specifična za kalcij, emitira svjetlost na 422,7 nm. Dok ovo svjetlo prolazi kroz atomizirani uzorak, atomi kalcija u osnovnom stanju apsorbiraju svjetlo. Količina apsorbirane svjetlosti izravno je proporcionalna koncentraciji kalcija u uzorku. Instrument za AAS mjeri smanjenje intenziteta svjetlosti dok ona prolazi kroz uzorak. Ovo smanjenje (apsorbancija) mjeri se detektorom i uspoređuje s kalibracijskom krivuljom pripremljenom iz standarda s poznatim koncentracijama kalcija [21]. Dobiveni podaci koriste se za izračun koncentracije kalcija u izvornom uzorku mlijeka. Prednosti metode AAS za mjerenje kalcija su osjetljivost u (ppm) i visoka specifičnost. Neki od izazova su smetnje matrice, propusnost uzorka, iako je AAS učinkovita za pojedinačne

elemente, može biti manje učinkovita kada se više elemenata treba analizirati istovremeno. Iako su cijene pojedinačnih analiza relativno niske, troškovi uređaja i potrebne infrastrukture su visoki, što može predstavljati značajnu prepreku za provedbu široke primjene ove metode [22].

2.3.2. Induktivno spregnuta plazma masena spektrometrija

Masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS), (engl. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*) vrlo je osjetljiva analitička tehnika koja se koristi za mjerenje elemenata u tragovima, uključujući i kalcij. Kombinira mogućnosti ionizacije induktivno spregnute plazme (ICP) s preciznom analizom mase spektrometrije mase (MS). ICP-MS je poznat po svojoj sposobnosti otkrivanja kalcija u iznimno niskim koncentracijama, sve do dijelova na trilijun (ppt). Slično AAS-u, priprema uzorka za ICP-MS uključuje digestiju uzorka mlijeka, često s kiselinama poput HNO_3 , kako bi se razgradio složeni matriks i oslobodili ioni kalcija. Digestirani uzorak se zatim razrijedi deioniziranom vodom ili drugim prikladnim otapalom kako bi se koncentracija kalcija dovela unutar mjerljivog raspona ICP-MS instrumenta. Pripremljeni tekući uzorak unosi se u ICP-MS instrument putem raspršivača koji tekućinu pretvara u fini aerosol. Ovaj aerosol se zatim prenosi pomoću plina nosača, obično argona, u induktivno spregnutu plazmu. Aerosol ulazi u plazmu, što je potpuno ioniziran, električki neutralan plin koji je stvoren pomoću RF (radio frekvencija) zavojnice. Temperatura plazme je izuzetno visoka, često prelazi 6 000 °C. U plazmi se uzorak podvrgava desolvataciji (uklanjanju otapala), atomizaciji (pretvorbi u atome) i ionizaciji (pretvorbi atoma u pozitivne ione). Za kalcij to znači pretvorbu Ca atoma u Ca^+ ione. Pozitivno nabijeni ioni kalcija ekstrahiraju se iz plazme i usmjeravaju u maseni spektrometar. Ovdje se odvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z) pomoću četvero-pola, analizatora vremena leta ili drugih vrsta analizatora mase. Budući da kalcij ima maseni broj 40, maseni spektrometar fokusiran je na otkrivanje iona s $m/z = 40$, što odgovara Ca^+ . Maseni spektrometar detektira broj iona Ca^+ pri $m/z = 40$, a taj broj je proporcionalan koncentraciji kalcija u uzorku. Instrument je kalibriran pomoću standardnih otopina s poznatim koncentracijama kalcija, što omogućuje točnu kvantifikaciju kalcija u uzorku mlijeka na temelju detektiranih broja iona. Prednost je opet visoka osjetljivost jer je to jedna od najosjetljivijih dostupnih tehnika, sposobna detektirati kalcij na ppt razinama. To ga čini idealnim za analizu elemenata u tragovima gdje je potrebno izmjeriti vrlo niske koncentracije kalcija. ICP-MS može istovremeno mjeriti više elemenata u jednom ciklusu, što ga čini učinkovitim za sveobuhvatnu analizu elemenata, uključujući kalcij, željezo, cink i druge. Visoka temperatura plazme smanjuje kemijske smetnje, dok sposobnost

masenog spektrometra za razlikovanje iona prema omjeru mase i naboja smanjuje spektralne smetnje. Nedostaci ove metode u mljekarskoj industriji uključuju složenost instrumenata i visoke troškove, budući da su i oprema i obučavanje operatera skupi. Složena matrica mlijeka i dalje može predstavljati izazove, poput potiskivanja ili pojačanja signala, iako se oni često mogu ublažiti odgovarajućom kalibracijom i optimizacijom metode. Za mlijeko koje je biološki produkt nije potrebna tolika preciznost, pošto postoji prirodna fluktuacija koncentracije [23].

2.3.3. Spektroskopija optičke emisije induktivno spregnute plazme

Spektroskopija optičke emisije induktivno spregnute plazme ICP-OES (engl. *Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*) moćna je analitička tehnika koja se koristi za detekciju i kvantifikaciju elemenata u tragovima, uključujući kalcij, u različitim matricama uzoraka kao što je mlijeko. ICP-OES, također poznat kao atomska emisijska spektroskopija (ICP-AES), oslanja se na mjerenje svjetlosti koju emitiraju pobuđeni atomi ili ioni kada se vrate u svoje osnovno stanje. Ta svjetlost karakteristična je za specifične elemente, što omogućuje njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Proces počinje pripremom uzorka, gdje se uzorak mlijeka obično digestira pomoću kiselina, poput HNO_3 , za razgradnju proteina, masti i drugih složenih komponenti, oslobađajući kalcij u otopinu. Digestirani uzorak se zatim razrijedi deioniziranom vodom kako bi se koncentracija kalcija dovela unutar odgovarajućeg raspona za analizu. Pripremljeni tekući uzorak se unosi u instrument za ICP-OES pomoću raspršivača. Raspršivač pretvara tekući uzorak u fini aerosol, koji se zatim prenosi protokom plina argona u plazma plamenik. Aerosol se prenosi kroz komoru za raspršivanje kako bi se uklonile veće kapljice, osiguravajući da samo najfinija maglica dopre do plazme. Aerosol ulazi u plazmu koju stvara RF zavojnica. Plazma je izuzetno vruća i doseže temperaturu od oko 6 000 do 10 000 °C. U ovom visokoenergetskom okruženju, uzorak prolazi kroz desolvataciju, atomizaciju i ekscitaciju. Kako se pobuđeni atomi kalcija vraćaju u svoje osnovno stanje, emitiraju svjetlost na specifičnim valnim duljinama karakterističnim za kalcij. Najistaknutija linija emisije za kalcij u ICP-OES-u je na valnoj duljini 422,673 nm [24]. Intenzitet emitiranog svjetla na ovoj valnoj duljini izravno je proporcionalan koncentraciji kalcija u uzorku. Emitirana svjetlost se skuplja i prolazi kroz monokromator ili polikromator, koji razdvaja svjetlost na komponente valnih duljina. Detektor mjeri intenzitet svjetla na određenim valnim duljinama koje odgovaraju kalciju. Instrument je kalibriran pomoću standardnih otopina s poznatim koncentracijama kalcija, što omogućuje točnu kvantifikaciju kalcija u uzorku na temelju intenziteta emitiranog svjetla. Prednosti metode su visoka osjetljivost i preciznost te mogućnost analize više elemenata u jednom ciklusu, što ju čini vrlo učinkovitom za sveobuhvatnu elementarnu analizu složenih

uzoraka poput mlijeka. Metoda nudi široki linearni dinamički raspon, omogućujući točnu kvantifikaciju kalcija u širokom rasponu koncentracija, od razina u tragovima do glavnih komponenti. Relativno je brza tehnika. Poteškoće stvaraju složena matrica mlijeka, smetnje drugih elementa te visoki početni troškovi i održavanje [25].

2.3.4. Potencimetrija

Potencimetrija u kojoj se koriste ion-selektivne elektrode (ISE) je poznata tehnika za mjerenje iona u različitim uzorcima, uključujući mlijeko koristeći kalcijevu ion-selektivnu elektrodu za mjerenje kalcija (Ca^{2+}). ISE je vrsta elektrokemijskog senzora koji je selektivan za ione analita, u ovom slučaju kalcija, što znači da može detektirati i mjeriti aktivitet slobodnih iona u otopini. Ova metoda je posebno korisna jer izravno mjeri aktivitet kalcijevih iona bez potrebe za složenom pripremom uzorka. ISE za kalcij se obično sastoji od membrane koja selektivno stupa u interakciju s ionima kalcija. Najčešće se koriste ISE s tekućom membranom u kojoj se nalazi ionofor selektivan na kalcij. Kada ioni kalcija u uzorku stupaju u interakciju s ionoforom, stvara se razlika potencijala (napon) na membrani. Taj se potencijal mjeri u odnosu na referentnu elektrodu, a rezultirajući napon proporcionalan je koncentraciji kalcijevih iona u otopini. Uzorci poput mlijeka pripremaju se razrjeđivanjem s puferском otopinom kako bi se održale konstantna ionska jakost i pH vrijednost, koje su ključne za točna mjerenja [26]. Pufer također pomaže smanjiti smetnje drugih iona. ISE se mora kalibrirati korištenjem standardnih otopina poznatih koncentracija kalcija. Dobivena kalibracijska krivulja koristi se za određivanje koncentracije kalcija u nepoznatim uzorcima. Prednosti korištenja ISE-a su selektivnost, jednostavnost, brzo mjerenje, relativno jeftina metoda. Ograničenja su prisutnost drugih iona i relativno mala preciznost pri niskim koncentracijama kalcija [27].

2.3.5. Kompleksometrijska titracija (EDTA titracija)

Kompleksometrijska titracija, posebno korištenjem etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), je analitička tehnika za kvantificiranje kalcijevih iona (Ca^{2+}) u različitim uzorcima, uključujući mlijeko. Ova se metoda temelji na stvaranju stabilnog kompleksa između iona kalcija i EDTA, kelirajućeg sredstva koje se snažno veže na ione metala. U kompleksometrijskoj titraciji, EDTA djeluje kao ligand koji tvori kompleks u omjeru 1:1 s ionima kalcija u otopini. EDTA ima četiri karboksilne skupine i dvije amino skupine koje mogu donirati elektronske parove kalciju, učinkovito "hvatajući" kalcijev ion i formirajući stabilan, bezbojan kompleks. Proces titracije uključuje postupno dodavanje otopine EDTA uzorku koji sadrži kalcij dok se svi slobodni ioni kalcija ne kompleksiraju. Krajnja točka titracije obično se označava promjenom boje, koja se

postiže uporabom indikatora. Uzorak mlijeka obično se razrijedi destiliranom vodom i puferira na pH od oko 10. Ovaj pH je važan jer osigurava laku reakciju između EDTA i iona kalcija i također pomaže u održavanju učinkovitosti indikatora metalnih iona. Uzorku se dodaje odgovarajući indikator, kao što je Eriokrom crno T (engl. *Eriochrome Black T*) ili Mureksid. Ovi indikatori tvore slabe komplekse s kalcijevim ionima, što rezultira jasnom bojom otopine. EDTA otopina se polako dodaje iz birete u uzorak uz stalno miješanje. Kako se EDTA veže na slobodne ione kalcija, nastaje kompleks kalcij-EDTA. Titracija se nastavlja dok se svi ioni kalcija u uzorku ne kompleksiraju s EDTA. Krajnja točka titracije označena je jasnom promjenom boje u otopini. Na primjer, s Eriokrom Crno T kao indikatorom, otopina se mijenja iz vino-crvene u plavu kada su svi kalcijevi ioni kompleksirani s EDTA, a indikator se oslobađa u otopinu u svom slobodnom obliku. Koncentracija kalcija u uzorku određena je izračunavanjem količine EDTA koja se koristi za postizanje krajnje točke. Budući da je stehiometrija reakcije 1:1, količina EDTA izravno odgovara količini kalcija prisutnog u uzorku. Prednosti metode su preciznost, jednostavnost te laka prilagodba tehnike za određivanje drugih metalnih iona. Ograničenja metode su smetnje drugih metalnih iona, te metoda zahtjeva ručni rad što dovodi do varijacija u točnosti rezultata koja ovisi o vještini kemičara [28].

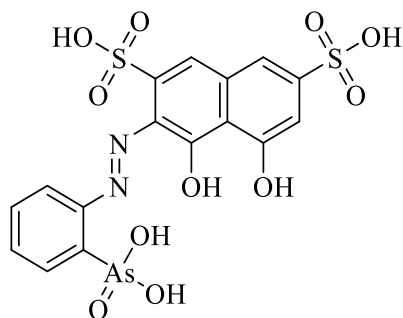
2.3.6. Kolorimetrijske metode

Kolorimetrijska analiza je analitička tehnika koja se koristi za mjerenje koncentracije tvari promatranjem intenziteta boje nastale u kemijskoj reakciji. Za mjerenje kalcija u mlijeku, kolorimetrijski testovi temelje se na reakciji kalcijevih iona (Ca^{2+}) sa specifičnim reagensima koji izazivaju promjenu boje. Promjena boje ili njenog intenziteta, koja je izravno proporcionalna koncentraciji kalcija, mjeri se spektrofotometrom ili kolorimetrom. Kolorimetrijski testovi za kalcij obično uključuju upotrebu kromogenog reagensa koji se specifično veže na ione kalcija, tvoreći obojeni kompleks. Najčešće korišteni reagensi u takvim testovima uključuju *o*-krezolftalein komplekson (OCPC) i Arsenazo III. Kada ioni kalcija reagiraju s tim reagensima, formira se kompleks koji pokazuje različitu boju. Intenzitet boje se mjeri na određenoj valnoj duljini, a taj se intenzitet povezuje s koncentracijom kalcija u uzorku na temelju kalibracijske krivulje. Uzorak mlijeka obično se razrijedi do odgovarajuće koncentracije, čime se osigurava da sadržaj kalcija bude unutar linearnog raspona metode. Uzorak se također može tretirati kako bi se uklonili proteini ili druge interferirajuće tvari koje bi mogle utjecati na točnost analize. Kolorimetrijski reagens npr. Arsenazo III dodaje se uzorku mlijeka. Ovi reagensi su poznati po svojoj visokoj selektivnosti i osjetljivosti na ione kalcija. Kada se pomiješa s uzorkom, reagens se veže na ione kalcija, tvoreći obojeni kompleks. Smjesa

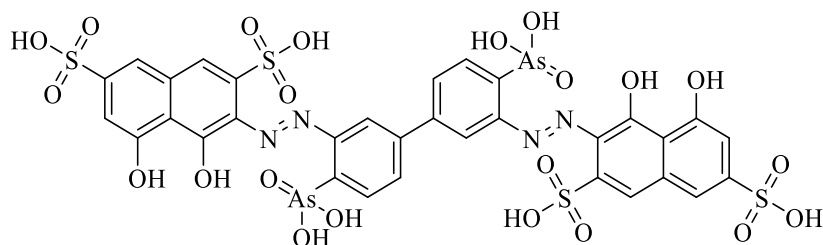
se ostavlja da reagira određeni period, obično nekoliko minuta, kako bi se osiguralo potpuno formiranje kompleksa. Reakcija se obično odvija u kontroliranim uvjetima, kao što su određeni pH i temperatura, kako bi se optimizirao razvoj boje. Nakon završetka reakcije, spektrofotometrom ili kolorimetrom mjeri se intenzitet boje. Mjerenje se provodi na određenoj valnoj duljini koja odgovara maksimalnoj apsorbciji kompleksa kalcij-reagens. Kalibracijska krivulja se priprema korištenjem standardnih otopina kalcija poznatih koncentracija. Vrijednosti apsorbcije standarda iscrtavaju se u odnosu na njihove koncentracije kako bi se dobila krivulja. Zatim se određuje koncentracija kalcija u uzorku mlijeka usporedbom njegove vrijednosti apsorbcije s kalibracijskom krivuljom. Arsenazo III tvori plavi kompleks s ionima kalcija u blago kiseloj otopini. Apsorbancija se obično mjeri na oko 650 nm. Arsenazo III je poznat po svom jakom afinitetu vezanja na kalcij, što ga čini pogodnim za određivanje niskih koncentracija. Prednosti kolorimetrijskih metoda su jednostavnost, kolorimetrijske testove relativno je jednostavno izvesti i ne zahtijevaju složene instrumente. Te prednosti čine metodu prikladnom za rutinske analize u istraživačkim i industrijskim laboratorijima, a mogućnost detekcije vrlo niske koncentracije kalcija čini ju prikladnom za različite vrste uzoraka. Postupak je brz, a rezultati se mogu dobiti unutar nekoliko minuta nakon završetka reakcije. Na točnost kolorimetrijskih analiza može utjecati prisutnost drugih metalnih iona, pogotovo magnezijevih, ili tvari u uzorku koje također mogu reagirati s reagensom ili uzrokovati zamućenje, što dovodi do pogrešnih rezultata. Priprema uzorka i reagensa, kao i postupak mjerenja, zahtijevaju pažljivo rukovanje kako bi se izbjegla kontaminacija i osigurali dosljedni rezultati.

2.3.7. Arsenazo Reagensi

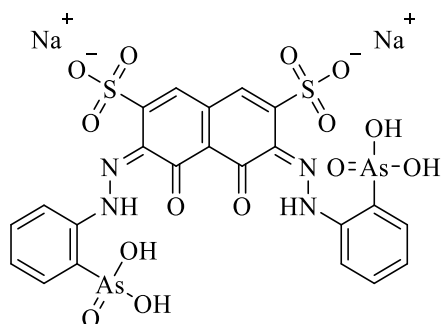
Postoje tri varijante Arsenazo reagensi: Arsenazo I (Slika 1.), Arsenazo II (Slika 2.) i Arsenazo III (Slika 3.)



Slika 1. Arsenazo I



Slika 2. Arsenazo II



Slika 2. Arsenazo III

Ovi kolorimetrijski reagensi su azo spojevi s derivatima kromotropne kiseline koji se koriste u analitičkoj kemiji za detekciju metalnih iona, posebno za kompleksiranje s metalnim ionima. Arsenazo I je monoazo spoj izveden iz reakcije kromotropne kiseline s *o*-aminofenilarsonskom kiselinom. Sadrži jednu arsonofenilazo skupinu. Stvara relativno slabe komplekse s metalnim ionima. Zbog niske stabilnosti prvenstveno se koristi kao indikator u kelatometrijskim titracijama za elemente poput torija, plutonija i elemenata rijetkih zemalja. Selektivnost Arsenaza I može se poboljšati podešavanjem pH, što ga čini korisnim za otkrivanje određenih elemenata poput torija. Arsenazo II je strukturno složeniji od Arsenaza I, sadrži dvije arsonofenilazo skupine vezane na dvije molekule kromotropne kiseline. Ovo udvostručenje azo

skupina povećava njegovu sposobnost vezanja. Stvara stabilnije komplekse od Arsenaza I, iako njegove dvije azo skupine djeluju neovisno tijekom kompleksiranja. Raspon elemenata na koje se Arsenazo II može vezati sličan je Arsenazu I, ali se pojavljuje u nešto kiselijem pH rasponu. Može otkriti širi raspon metalnih iona zbog svoje povećane stabilnosti. Arsenazo III je bisazo spoj, sintetiziran iz kromotropne kiseline i *o*-aminofenilarsonske kiseline. Njegovu strukturu čine dvije arsonofenilazo skupine, ali one su dio jednog konjugiranog sustava. Ovo čini Arsenazo III drugačijim od Arsenaza II, budući da funkcionalne skupine međusobno djeluju unutar zajedničke konjugirane strukture. Stvara vrlo stabilne komplekse s metalnim ionima, posebno s onima koji tvore dvostruko ili trostruko nabijene katione, poput uranija, torija, cirkonija i kalcija. Ovi kompleksi su stabilni čak i u jako kiselim otopinama, čineći Arsenazo III vrlo pouzdanim za precizna i ponovljiva mjerenja. Njegovi kompleksi pokazuju jedinstveni spektar s dvije apsorpcijske trake zbog različitog ponašanja dviju konjugiranih azo skupina. Ova se boja općenito smatra najosjetljivijom i najspektivnijom od sve tri boje za detekciju metalnih iona, sa sposobnošću detekcije elemenata u vrlo niskim koncentracijama (0,01 – 0,001 µg/mL). Zaključno, napredovanje od Arsenazo I do Arsenazo III odražava poboljšanja u stabilnosti kompleksa i afinitetu vezanja metala, pri čemu je Arsenazo III najnapredniji i naširoko korišten reagens za detekciju različitih metala uključujući i kalcij u analitičkoj kemiji [29, 30].

2.4. Metoda standardne adicije

Metoda standardne adicije je kvantitativna analitička metoda koja se često primjenjuje kada analit sadrži više komponenti koje uzrokuju utjecaje matriksa, pri čemu dodatne komponente mogu smanjiti ili pojačati intenzitet signala analita. To uzrokuje značajne pogreške u rezultatima analize. Standardna adicija se obično koristi za uklanjanje učinaka matrice iz mjerenja, budući da se pretpostavlja da matrica jednako utječe na sva mjerenja. Osim toga, koristi se za korekciju kemijskih faznih separacija izvedenih u procesu ekstrakcije. Metoda se provodi očitavanjem eksperimentalnog intenziteta signala otopine nepoznate koncentracije, a zatim mjerenjem intenziteta otopine nepoznate koncentracije uz različite količine dodanog poznatog standarda. Podaci se iscrtavaju kao intenzitet signala u odnosu na količinu dodanog standarda. Sama nepoznanica, bez dodanog standarda, iscrtana je na y-osi. Linija najmanjih kvadrata siječe x-os u negativnoj točki koncentracije nepoznanice.

Izračun nepoznatog faktora u jednadžbi pravca prema slijedećoj jednadžbi:

$$y = ax + b \rightarrow x = \frac{y}{a} + \frac{-b}{a} \quad (1.)$$

Izračun nepoznatog faktora koristeći standardnu adiciju izračunava se po sljedećoj jednadžbi, uz uvijet $y=0$:

$$x = \frac{\text{abs}(-b)}{a} \quad (2.)$$

abs = apsolutna vrijednost.

2.5. Instrumentacija za kolorimetrijska mjerenja

Kolorimetrijska mjerenja uključuju procjenu intenziteta boje u uzorku. Kolorimetar je instrument koji uspoređuje količinu svjetlosti koja prolazi kroz otopinu s količinom koja može proći kroz uzorak čistog otapala. Kolorimetar sadrži fotoćeliju koja može detektirati količinu svjetlosti koja prolazi kroz otopinu koja se ispituje. Struja koju proizvodi fotoćelija ovisi o količini svjetlosti koja je pogodi nakon prolaska kroz obojenu otopinu. Što je veća koncentracija bojila u otopini, veća je apsorpcija svjetlosti, a manje svjetla koje prolazi kroz otopinu znači manju struju koju stvara fotoćelija. Kolorimetrom se uzimaju tri očitavanja duž vidljivog spektra kako bi dobio grubu procjenu uzorka boje. Tradicionalno se riječ 'kolorimetar' koristi za uređaj koji ima tri filtera koji simulira ljudski vid [31].

2.6. Spektrofotometri

Spektrofotometar je instrument za mjerenje propusnosti uzorka na diskretnim valnim duljinama. Spektrofotometri obično osvjetljavaju uzorak monokromatskim svjetlom koje stvara difrakcijska rešetka iz izvora svjetlosti i omogućuju mjerenje količine reflektiranog ili propuštenog svjetla na diskretnim valnim duljinama isporukom naponskog signala uređaju za prikaz, obično galvanometru. Signal se mijenja kako se mijenja količina svjetlosti koju apsorbira objekt. Točnost ovih uređaja ovisi o mnogim čimbenicima, ali jedan od najvažnijih čimbenika je spektralna propusnost (tj. raspon valnih duljina u svakoj točki spektra na kojoj se vrši mjerenje). Ovi su instrumenti ključni u industrijama kao što su prehrambena, kozmetička, tekstilna i kemijska, gdje su precizna mjerenja boja bitna za osiguravanje kvalitete proizvoda [31]. Glavne vrste spektrofotometara koji se koriste za mjerenje boje i izgleda su:

- Spektrofotometri s jednim snopom: ovo su bili najraniji dizajni spektrofotometara. Kod ove vrste, sva svjetlost prolazi kroz uzorak, pa ju je potrebno ukloniti kako bi se izmjerio intenzitet upadne svjetlosti. Jednostavniji je i jeftiniji, ali manje stabilan tijekom uzastopnih mjerenja.
- Spektrofotometri s dva snopa: poboljšavaju dizajn s jednim snopom dijeleći svjetlost u dva snopa. Jedna zraka se koristi kao referenca, dok druga prolazi kroz uzorak,

omogućujući istovremenu usporedbu. Sustavi s dvostrukom snopom mogu se dalje podijeliti na:

- dvostruke detektorske sustave gdje se svaka zraka mjeri vlastitim detektorom;
- sustave s jednim detektorom gdje rezač (engl. *chopper*) izmjenjuje zrake uzorka i referentne zrake kroz jedan detektor.
- Spektrofotometri s podijeljenim snopom: funkcioniraju slično sustavima s dvostrukim snopom, ali koriste razdjelnik snopa umjesto rezača, šaljući svjetlost istovremeno duž uzorka i standarda referentne vrijednosti.
- Spektrofotometri s rešetkastim monokromatorom: koriste difrakcijske rešetke za raspršivanje svjetlosti na njezine sastavne valne duljine. Dizajn rešetke omogućuje jednostavniji odabir valne duljine, zbog čega su ovi spektrofotometri najšire korišteni zbog svoje stabilnosti i preciznosti.
- Spektrofotometri s dvostrukim monokromatorom: oni su dizajnirani za pružanje vrlo preciznih mjerenja za fluorescentne materijale pomoću dva monokromatora. Prvi osvjetljava uzorak monokromatskim svjetlom, dok drugi analizira emitirano svjetlo, razdvajajući ga na više valnih duljina [31].

2.7. Beer-Lambertov zakon

Beer-Lambertov zakon koristi se za opisivanje apsorpcije svjetlosti dok ona prolazi kroz medij. To je kombinacija dvaju zakona. Lambert-ov zakon (ili Bouguerov zakon) navodi da je udio svjetlosti koju apsorbira tvar neovisan o intenzitetu svjetlosti, što znači da će slojevi jednake debljine tvari propuštati isti udio svjetlosti u danom trenutku valna duljina. Beer-ov zakon kaže da je apsorpcija svjetlosti proporcionalna koncentraciji apsorbirajućih molekula na njenom putu. Matematički izraz Beer-Lambertovog zakona prikazan u sljedećoj jednadžbi:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c l} \quad (3.)$$

gdje je:

I_0 intenzitet upadne svjetlosti

I intenzitet propuštene svjetlosti

ϵ koeficijent molarne ekstinkcije

c koncentracija apsorbirajuće tvari

l duljina puta svjetlosti kroz apsorbirajući medij.

Zakon vrijedi pod određenim uvjetima: apsorbirajuće molekule moraju djelovati neovisno, medij mora biti homogen i ne smije raspršivati zračenje. Svjetlo također mora biti monokromatsko i sastojati se od paralelnih zraka. Ako ovi uvjeti nisu ispunjeni, dolazi do odstupanja od Beer-Lambertova zakona [31].

2.8.Primjena digitalne fotografije u svrhu određivanja promjene boje i intenziteta boje za kolorimetrijska mjerenja

Digitalna fotografija može snimiti slike objekata bez potrebe za fizičkim kontaktom. Ovo je osobito korisno za mjerenje varijacija boja u objektima koji se ne mogu jednostavno smjestiti u tradicionalne instrumente. Analiza raznobojnih i teksturiranih površina video kamere i digitalni fotografski sustavi mogu mjeriti boju na objektima složenog dizajna, poput tekstila ili pakiranja. Ovo je korisno u industrijama u kojima je dosljednost boja ključna. Korištenje digitalnih fotografskih sustava u proizvodnim linijama omogućuje kontinuirano praćenje boja bez prekida tijekom rada. Ovi sustavi daju povratne informacije u stvarnom vremenu i korisni su za kontrolu kvalitete, iako mogu biti manje precizni od spektrofotometra. Digitalna fotografija nudi veću prostornu razlučivost u usporedbi s tradicionalnim kolorimetrijskim instrumentima, što je čini idealnom za analizu uzoraka ili finih detalja u boji. Unatoč nekim ograničenjima u točnosti mjerenja u usporedbi s instrumentima poput spektrofotometra, sustavi digitalne fotografije sve se više koriste u industrijskim primjenama zbog svoje isplativosti i mogućnosti integracije [31].

2.9.Pripreme uzoraka mlijeka za mjerenje kalcija

2.9.1. Primjeri pripreme uzorka mlijeka za analizu Arsenazo III

Prikupi se reprezentativni uzorak mlijeka. Razrijedi se uzorak mlijeka destiliranom vodom kako bi se smanjio učinke matrice i koncentracija kalcija uvela u mjerljivi raspon za Arsenazo III. Razrijeđeni uzorak mlijeka filtrira se pomoću finog filter papira ili membranskog filtera kako bi se uklonile sve čestice koje bi mogle ometati spektrofotometrijsko mjerenje. Pomiješa se filtrirani uzorak s reagensom Arsenazo III u blago kiselom mediju, zatim izmjeri apsorbanacija na odgovarajućoj valnoj duljini [32]. Tvrtka Perkin-Elmer [33] opisuje postupak određivanja Ca, Mg, K, Na i Cu u mlijeku. Mliječni proteini uključujući kazein talože se pomoću trikloroetane kiseline (TCA). Uzorci se zatim filtriraju, a filtrat analizira AAS-om. Alikvotu mlijeka od 5 mL u odmjerneju tikvici od 100 mL doda se 50 mL 24 % TCA i razrijedi do

volumena tikvice deioniziranom vodom. Uzorak se trese u intervalima od 5 minuta tijekom 30 minuta i filtrira. Alikvot od 5 mL filtrata prenese se u odmjernu tikvicu od 50 mL, doda se 1 mL 5 % otopine lantana i dopuni do volumena deioniziranom vodom. Zatim se priprema miješani standard koji sadrži 5,0 mg/L Ca, 0,6 mg/L Mg, 1,6 mg/L Na, 5,0 mg/L K, 500 mg/L La i 1,2 % TCA. Sva određivanja treba provesti u odnosu na slijepu probu reagensa koja sadrži 500 mg/L La i 1,2 % TCA [33].

2.9.2. Pripreme uzorka za određivanja ukupnog kalcija

Za određivanje ukupnog kalcija u mlijeku potrebna je precizna i ujednačena metoda, koja često uključuje digestiju mlijeka radi razgradnje složenih struktura i oslobađanja vezanog kalcija. Uzorak mlijeka se digestira pomoću HNO₃ ili slične jake kiseline. Ovaj proces razgrađuje organske komponente, pretvarajući sav kalcij prisutan u mlijeku u topive oblike. Kako bi se osigurala potpuna razgradnja uzorka, može se primijeniti pepeljenje na visokim temperaturama. Mlijeko se nekoliko sati spaljuje u peći na približno 550 °C. Ovaj korak osigurava uništenje organskog materijala, ostavljajući samo anorganske minerale poput kalcija. Pepeo ili uzorak razgrađen kiselinom razrijedi se deioniziranom vodom ili otopinom kiseline kako bi se pripremio za analizu [34, 35].

2.9.3. Pripreme uzorka za određivanja slobodnog kalcija

Za određivanje ionskog (ili topljivog) kalcija koji nije vezan unutar micela kazeina, već je slobodno dostupan u mliječnom serumu, mlijeko se prvo centrifugira pri velikim brzinama (25 000 x g – 100 000 × g tijekom 1 sata na 34 °C) kako bi se odvojila serumska faza od kazeinskih micela i masti. Ovo izolira topive (ionske) komponente mlijeka [30, 34]. Supernatant (mliječni serum) se filtrira kroz filtere od 0,45 µm i 0,22 µm kako bi se osiguralo uklanjanje svih zaostalih čestica, ostavljajući samo topljivi kalcij u otopini. Filtrirani serum razrijedi se deioniziranom vodom ili blagom kiselinom, kako bi se kalcij održao u njegovom topljivom obliku za analizu.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Korišteni reagensi i kemikalije

Svi reagensi i kemikalije upotrijebljeni za izradu ovog rada bili su analitičke čistoće, korišteni su:

- Arsenazo III (Fluka, Švicarska)
- kalcijev klorid (CaCl_2 , Kemika, Hrvatska)
- natrijev acetat (CH_3COONa , Kemika, Hrvatska)
- etanol, apsolutni, bezvodni (Carlo Erba, Francuska)
- ultra čista demineralizirana voda, električne vodljivosti $0,05 \mu\text{S/cm}$.

3.2. Korišteni uređaji i instrumenti

- Analitička vaga: SECURA225D-1S (Sartorius, Gottingen, Germany) rezolucije 0,01 mg
- Spectrofotometar: UV-1700, (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Telefon Galaxy S20 FE te njegove kamere (Samsung, Korea):
Širokokutna: 12 MP, f/1,8, 26 mm, 1/1,76", $1,8 \mu\text{m}$, dual pixel PDAF, OIS
Telefoto: 8 MP, f/2,4, 76 mm, 1/4,5", $1,0 \mu\text{m}$, PDAF, OIS
- Ultrazvučna kupelj: Sonorex RK 52 H, (Bandelin, Berlin, Germany)

3.3. Priprema otopina reagensa i standarda

Za pripremu otopina krutine su odvagane na analitičkoj vagi i kvantitativno prenesene u odmjerne tikvice odgovarajućeg volumena. Koncentracije pripremljenih otopina prikazane su u Tablici 1. Otopina Arsenaza III priređena je u puferu natrijeva acetata po uputama tvrtke Randox za njihove uređaje [36]. Otopina Arsenaza III koncentracije 250 μM pripremljena je otapanjem reagensa u deioniziranoj vodi u količini od 0,02050 g, te natrijeva acetata koncentracije 54,2 mM u količini od 0,73763 g u jednoj odmjernoj tikvici od 100 mL. Otopina kalcijeva klorida koncentracije 183,1 mM pripremljena je otapanjem soli u deioniziranoj vodi u količini od 1,3460 g u odmjernoj tikvici od 50 mL. Otopina natrijeva hidroksida pripremljena je otapanjem krutine u deioniziranoj vodi u količini od 0,20000 g u odmjernoj tikvici od 50 mL.

Tablica 1. Priprema otopina

Naziv spoja	Kratica	Koncentracija	Jedinica veličine
dinatrijeva sol 3,6-bis(2,2'-arsonofenilazo)-4,5-dihidroksi-2,7-naftalendisulfonske kiseline	Arsenazo III	250	μM
natrijev acetat	NaAc	54,2	mM
natrijev hidroksid	NaOH	0,1	M
kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	183,1	mM

3.4. Optimizacija Arsenazo III metode za određivanje koncentracije kalcija u mlijeku

3.4.1. Priprema otopina za određivanje optimalnog omjera koncentracije Arsenazo III i Ca^{2+} iona

Prikaz pripreme jednakih koncentracija Arsenaza III ($15 \mu\text{M}$) te različitih koncentracija Ca^{2+} u otopinama volumena $5\ 000 \mu\text{L}$ naveden je u Tablici 2. Redoslijed dodavanja je bio prvo demineralizirana voda, zatim otopina kalcija pa otopina Arsenaza III u volumenu od $300 \mu\text{L}$.

Tablica 2. Priprema otopina U0 do U18.

Otopina	$V(\text{Ca}^{2+}) (\mu\text{L})$	$c(\text{Ca}^{2+}) (\mu\text{M})$	$V(\text{H}_2\text{O}) (\mu\text{L})$
U0	0	/	4700
U1	20	292,96	4680
U2	60	292,96	4640
U3	25	1464,8	4675
U4	50	1464,8	4650
U5	100	1464,8	4600
U6	125	1464,8	4575
U7	150	1464,8	4550
U8	35	7324	4665
U9	40	7324	4660
U10	45	7324	4655
U11	50	7324	4650
U12	75	7324	4625
U13	100	7324	4600
U14	170	7324	4530
U15	340	7324	4360
U16	70	36620	4630
U17	135	36620	4565
U18	135	183100	4565

3.4.2. Određivanje optimalne koncentracije Arsenazo III za određivanje koncentracije kalcija u mlijeku

3.4.2.1. Serija B $c(\text{Arsenazo III}) = 15 \mu\text{M}$

Prikaz pripreme 10 otopina oznaka B1 do B10 jednakih volumena (5 000 μL), jednakih koncentracija Arsenaza III (15 μM) te različiti koncentracija Ca^{2+} od 0,9960 do 15,4096 μM naveden je u Tablici 3. Redoslijed dodavanja je bio prvo demineralizirana voda, zatim otopina kalcija pa otopina Arseaza III u volumenu od 300 μL . Na Slici 4. su prikazane promijene boje otopina promjenom koncentracije Ca^{2+} .

Tablica 3. Priprema otopina serije B.

Otopina	$V(\text{Ca}^{2+})$ (μL)	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$V(\text{H}_2\text{O})$ (μL)
B1	17	292,96	4683
B2	45	292,96	4655
B3	72	292,96	4628
B4	99	292,96	4601
B5	127	292,96	4573
B6	154	292,96	4546
B7	181	292,96	4519
B8	208	292,96	4492
B9	236	292,96	4464
B10	263	292,96	4437



Slika 4. Serija B

3.4.2.2. Serija E $c(\text{Arsenazo III}) = 30 \mu\text{M}$

Prikaz pripreme 11 otopina oznaka E0 do E10 jednakih volumena (5 000 μL), jednakih koncentracija Arsenaza III (30 μM), te različitih koncentracija Ca^{2+} od 1,7578 do 29,2960 μM naveden je u Tablici 4. Redoslijed dodavanja je bio prvo demineralizirana voda, zatim otopina kalcija pa otopina Arseaza III u volumenu od 600 μL . Na Slici 5. su prikazane promijene boje otopina promjenom koncentracije Ca^{2+} .

Tablica 4. Priprema otopina serije E.

Otopina	$V(\text{Ca}^{2+})$ (μL)	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$V(\text{H}_2\text{O})$ (μL)
E0	0	/	4400
E1	30	292,96	4370
E2	90	292,96	4310
E3	30	1464,8	4370
E4	40	1464,8	4360
E5	50	1464,8	4350
E6	60	1464,8	4340
E7	70	1464,8	4330
E8	80	1464,8	4320
E9	90	1464,8	4310
E10	100	1464,8	4300



Slika 5. Serija E

3.4.2.3. Serija H $c_{\text{(Arsenazo III)}} = 50 \mu\text{M}$

Prikaz pripreme 11 otopina oznaka H0 do H10 jednakih volumena (5 000 μL), jednakih koncentracija Arsenaza III (50 μM), te različitih koncentracija Ca^{2+} od 2.9296 do 49,8032 μM vidi se u Tablici 5. Redoslijed dodavanja je bio prvo demineralizirana voda, zatim otopina kalcija pa otopina Arseaza III u volumenu od 1 000 μL . Na Slici 6. su prikazane promijene boje otopina promjenom koncentracije Ca^{2+} .

Tablica 5. Priprema otopina serije H.

Otopina	$V(\text{Ca}^{2+})$ (μL)	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$V(\text{H}_2\text{O})$ (μL)
H0	0	/	4000
H1	10	1464,8	3990
H2	30	1464,8	3970
H3	50	1464,8	3950
H4	65	1464,8	3935
H5	85	1464,8	3915
H6	100	1464,8	3900
H7	115	1464,8	3885
H8	135	1464,8	3865
H9	150	1464,8	3850
H10	165	1464,8	3835



Slika 6. Serija H

3.5. Određivanja koncentracije kalcija u uzorcima mlijeka

3.5.1. Mjerenje koncentracije Ca^{2+} u mlijeku

Pripremljeno je 4 uzoraka standardnom adicijom i slijepa proba (engl. *blank*) koja sadrži samo Arsenazo III i vodu. Uzorci (Mlijeko, Dodatak 1, Dodatak 2, Dodatak 3) pripremljeni su s 280 μL mlijeka faktorom razrjeđenja 166,66 (Tablica 6.) Redoslijed dodavanja je bio: prvo demineralizirana voda, potom otopina kalcija, zatim uzorak mlijeka i na kraju otopina Arsenaza III u volumenu od 1000 μL . Svi uzorci bili su jednakog volumena (5 000 μL).

Tablica 6. Priprema otopina za mjerenje koncentracije kalcija u mlijeku

Uzorak	$V(\text{Ca}^{2+})$ (μL)	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$V(\text{mlijeka})$ (μL)	Faktor razrjeđenja mlijeka	$V(\text{H}_2\text{O})$ (μL)
Blank	0	1464,8	/	/	4000
Mlijeko	0	1464,8	280	166,66	3720
Dodatak 1	20	1464,8	280	166,66	3700
Dodatak 2	40	1464,8	280	166,66	3680
Dodatak 3	60	1464,8	280	166,66	3660

3.5.2. Mjerenje koncentracije Ca^{2+} u filtratu mlijeka

Pripremljeno je 4 uzoraka standardnom adicijom i slijepa proba koji sadrži samo Arsenazo III i vodu. Uzorci (Filtrat, Dodatak 1, Dodatak 2, Dodatak 3) pripremljeni su s 500 μL mlijeka faktorom razrjeđenja 100 (Tablica 7.). Redoslijed dodavanja je bio: prvo demineralizirana voda, potom otopina kalcija, zatim uzorak mlijeka i na kraju otopina Arsenaza III u volumenu od 1000 μL . Svi uzorci bili su jednakog volumena (5 000 μL).

Tablica 7. Priprema otopina za mjerenje koncentracije kalcija u filtratu mlijeka

Uzorak	$V(\text{Ca}^{2+})$ (μL)	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$V(\text{filtrat})$ (μL)	Faktor razrjeđenja filtrata	$V(\text{H}_2\text{O})$ (μL)
Blank	0	/	/	/	4000
filtrat	0	/	500	100	3500
Dodatak 1	20	1464,8	500	100	3480
Dodatak 2	40	1464,8	500	100	3460
Dodatak 3	60	1464,8	500	100	3440

3.6. Određivanje optimalnih parametara za digitalne fotografije i mjerenje promjene boje uzoraka

Mjerenja su odrađena pomoću pametnog telefona marke Samsung modela Samsung Galaxy S20 FE. Mobitel je bio stacioniran pomoću držača mobitela, na hvataljci koja je mufom prihvaćena za stalak. Slikano je na magnetnoj ploči za pisanje na kojoj su bile postavljene bočice jedna po jedna. Druga magnetna ploča bila je postavljena okomito na prvu kako bi stvorila bijelu pozadinu. Osvjetljenje je bilo prirodno svjetlo, prostorno osvjetljenje te najbliže pozicionirane dvije led lampe topline osvjetljenja 4 000 K (Slika 7.). Očitavanja su se vršila pomoću besplatne aplikacije RGB Color Detector, koju je razvio The programmer, verzija 3.0.91, s maksimalnim detekcijskim radijusom (50), preuzete s Play Stora. Prilikom snimanja, osigurano je da detekcijski radijus bude barem upola manji od duljine bočice na slici, odnosno da detekcijski krug obuhvaća maksimalno polovicu bočice koja se slika. Tijekom testiranja, snimano je iz različitih kutova i udaljenosti, pri čemu je svaka serija obrađena zasebno. Završna mjerenja s uzorcima mlijeka provedena su pod istim uvjetima i postavkama kamere: ISO (160), brzina (1/1000) i bijela ravnoteža (4000 K).



Slika 7. Postolje za slikanje

4. Rezultati i rasprava

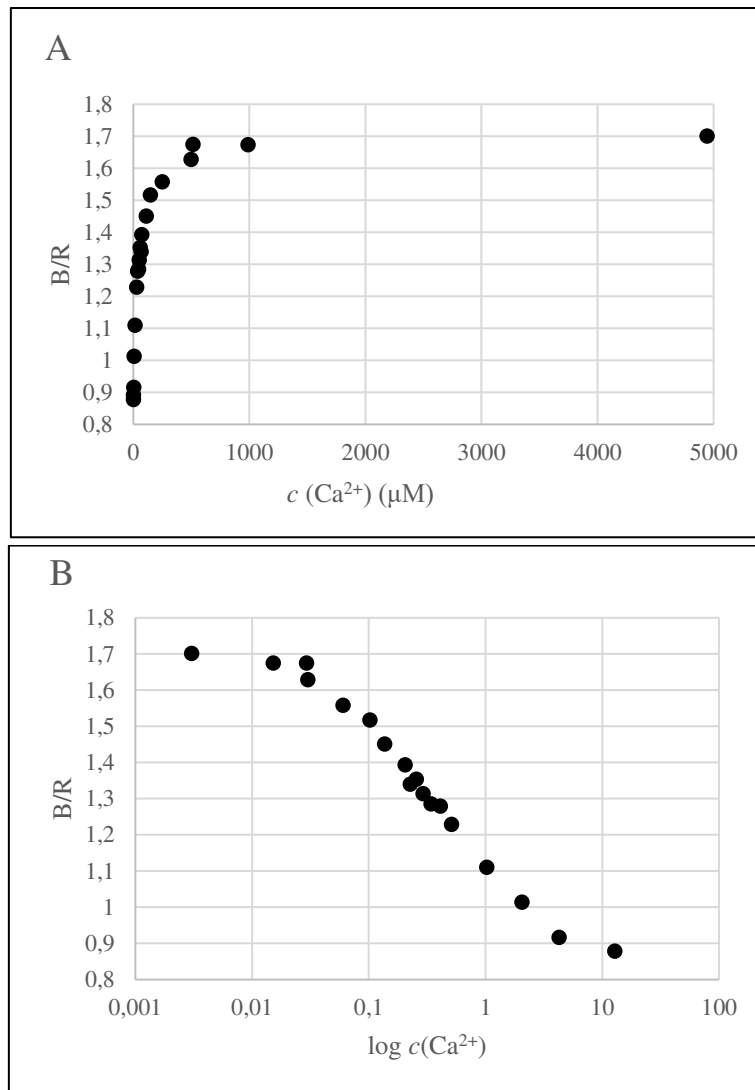
4.1. Određivanje optimalnog omjera koncentracije Arsenazo III i Ca^{2+} iona

Prikaz koncentracije Arsenaza III, koncentracije Ca^{2+} te njihovog omjera, RGB vrijednosti: crvene boje (R), plave boje (B), omjera plave i crvene boje (B/R) za otopine U0 do U18 navedene su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati ispitivanja uzoraka U0 do U18

Otopina	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$c(\text{Ars III})/c(\text{Ca}^{2+})$	R	B	B/R
U0	0		167,2	143,1	0,8552
U1	1,17184	12,8004	165,5	145,4	0,8785
U2	3,51552	4,2668	161,2	147,7	0,9163
U3	7,324	2,0481	149,3	151,3	1,0134
U4	14,648	1,0240	135,8	150,7	1,1097
U5	29,296	0,5120	118,9	146,1	1,2288
U6	36,62	0,4096	114,7	146,7	1,2790
U7	43,944	0,3413	114,9	147,7	1,2855
U8	51,268	0,2926	112,2	147,4	1,3137
U9	58,592	0,2560	112,6	152,4	1,3535
U10	65,916	0,2276	113,8	152,5	1,3401
U11	73,24	0,2048	109,3	152,3	1,3934
U12	109,86	0,1365	105,8	153,5	1,4509
U13	146,48	0,1024	100,4	152,3	1,5169
U14	249,016	0,0602	98,4	153,3	1,5579
U15	498,032	0,0301	94,5	153,9	1,6286
U16	512,68	0,0293	90,4	151,4	1,6748
U17	988,74	0,0152	91,9	153,9	1,6746
U18	4943,7	0,0030	91,3	155,3	1,7010

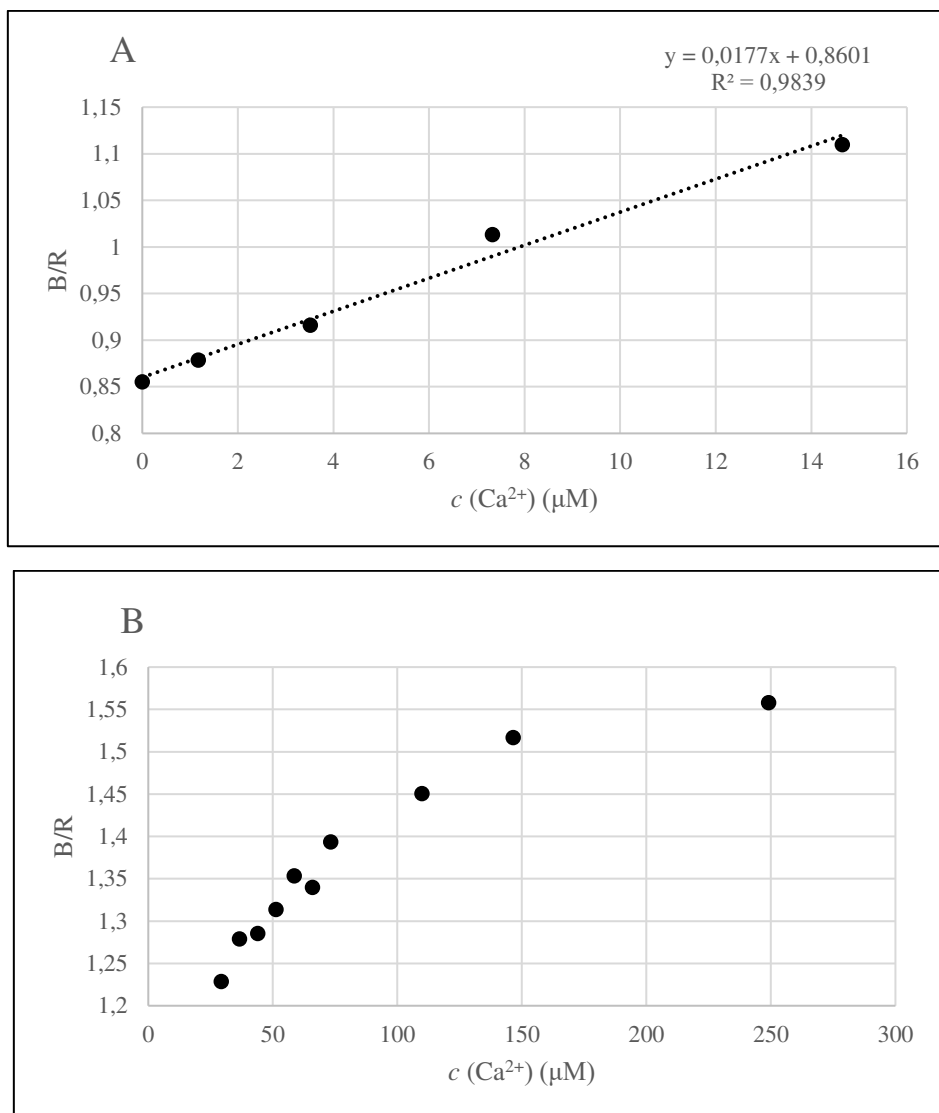
Nakon određivanja optimalnog omjera koncentracije reagensa Arsenazo III i koncentracija Ca^{2+} iona, dobiveni rezultati su prikazani u grafu na (Slika 8.A.) Detaljnom analizom rezultata ustanovilo se da promjena boje ovisi i o koncentraciji kalcijevih iona i njihovom omjeru s kompleksometrijskim indikatorom.



Slika 8.A. Prikazuje RGB vrijednosti B/R prema koncentraciji Ca^{2+} , 8.B. prikazuje RGB vrijednosti B/R prema $\log c(\text{Ca}^{2+})$ u uzorcima U0 od U18

Prvotno je bilo mišljenje da rezultati pokazuju logaritamsku ovisnost stoga je konstruiran graf s logaritmima koncentracije Ca^{2+} (Slika 8.B). Daljnjim pregledom rezultata primijećeno je da u određenom omjeru $c(\text{ArsIII})/c(\text{Ca}^{2+})$ postoji linearna ovisnost koncentracije Ca^{2+} i promjene boje.

U početnom dijelu grafa postoji suvišak kompleksometrijskog indikatora, i pod takvim okolnostima Ca^{2+} tvori kompleks omjera 1:1 [37], dok u drugom dijelu grafa gdje je suvišak Ca^{2+} iona mogu nastajati kompleksi s različitom stehiometrijom. U slučaju nastajanja kompleksa u omjeru 1:1 postoji linearna ovisnost promjene signala o koncentraciji Ca^{2+} iona (Slika 8.A.) dok u slučaju suviška analita ovisnost promjene boje o koncentraciji Ca^{2+} iona postaje složena (Slika 9.B).



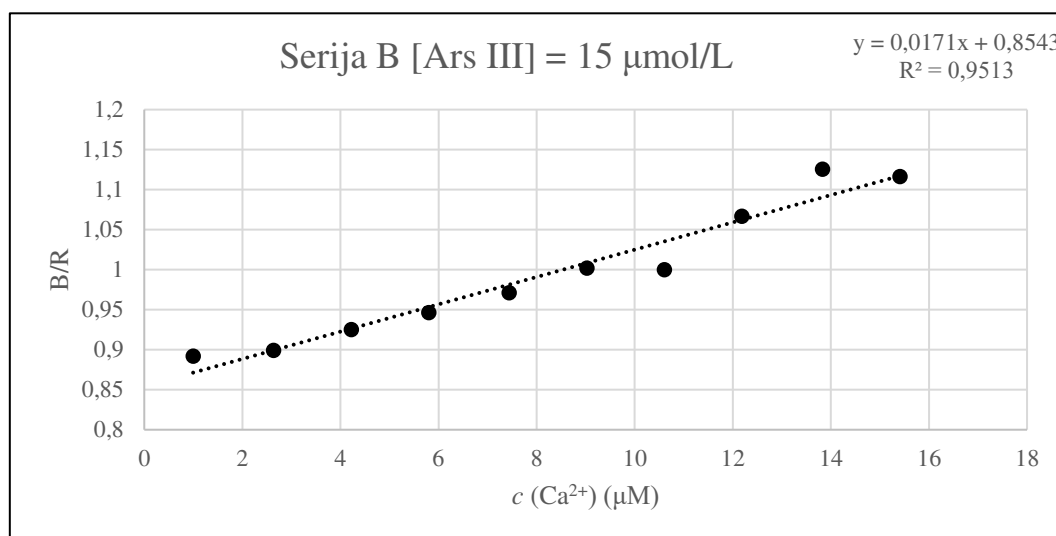
Slika 9. RGB vrijednosti B/R prema koncentraciji Ca^{2+} u uzorcima: A. sa suviškom Arsenazo III; B. sa suviškom Ca^{2+} iona.

Na osnovi gore navedenih rezultata za daljnju optimizaciju metode vrši se karakterizacija serije uzoraka sa suviškom Arsenao III indikatora. Serija B su otopine iste koncentracije Arsenaza III (15 μM) i omjera $c(\text{ArsIII})/c(\text{Ca}^{2+})$ od 15 do 1. Odnos koncentracije Ca^{2+} u uzorku s omjerom RGB vrijednosti plave i crvene boje je bio relativno linearan (Slika 10.), no linearnost nije postigla željenu $R^2 > 0,99$ te se pripremaju uzorci s većom koncentracijom Arsenazo III (serija E.) Iako je okom bila primjetna promjena boje povećanjem koncentracije Ca^{2+} (Slika 4.), postojala je sumnja da je prozirnost bila prevelika. Male promjene u udaljenosti od kamere ili promjena prirodne svjetlosti bila je dovoljna za različite rezultate.

Prikaz koncentracije Arsenaza III, koncentracije Ca^{2+} te njihovog omjera, RGB vrijednosti crvene boje (R), plave boje (B), omjera plave i crvene boje (B/R) za otopine serije B naveden je u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultati ispitivanja serije B.

Otopina	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	$c(\text{Ars III})/c(\text{Ca}^{2+})$	R	B	B/R
B1	0,996064	15,0592733	165	147,2	0,8921212
B2	2,63664	5,689058802	163,5	147	0,8990826
B3	4,218624	3,555661751	160,8	148,8	0,9253731
B4	5,800608	2,585935819	158,5	150	0,9463722
B5	7,441184	2,015808237	153	148,6	0,9712418
B6	9,023168	1,662387312	154,9	155,2	1,0019367
B7	10,605152	1,414406885	144,7	144,7	1
B8	12,187136	1,230805991	141	150,4	1,0666667
B9	13,827712	1,084778161	134,4	151,3	1,125744
B10	15,409696	0,973413103	139,1	155,3	1,116463



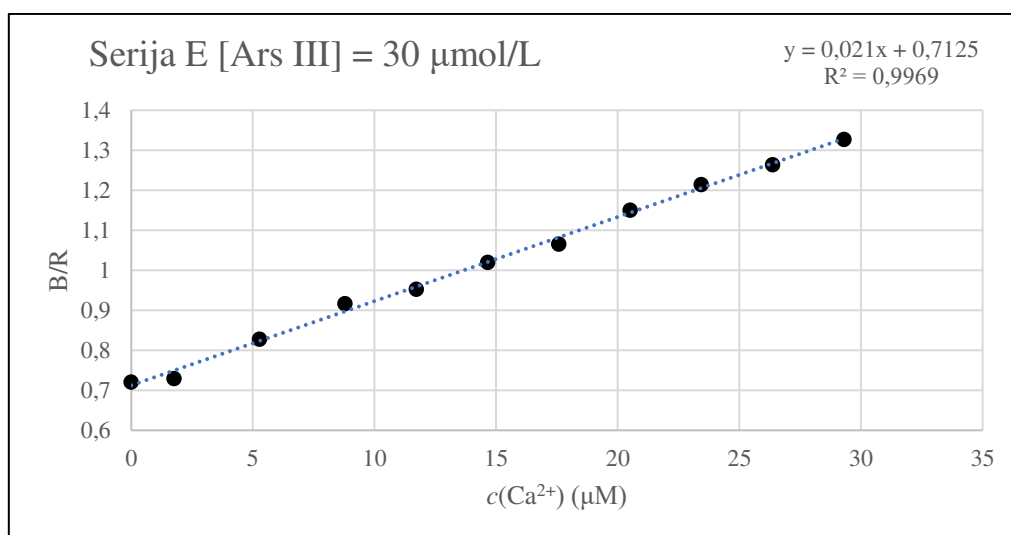
Slika 10. RGB vrijednosti B/R prema koncentraciji Ca^{2+} u uzorcima serije B

Serijske E su otopine pri sličnom omjeru $c(\text{ArsIII})/c(\text{Ca}^{2+})$ no pri većoj koncentraciji Arsenaza III pa zato i većoj koncentraciji Ca^{2+} . Napravljeno je 11 uzoraka no ovaj puta je dodan i uzorak koji ne sadrži dodani Ca^{2+} , drugim riječima mjereno je omjer B/R samo razrijeđene boje Arsenazo III. U ovoj seriji se dogodila okom primjetna promjena boje povećanjem koncentracije Ca^{2+} (Slika 5.), što je bilo bolje vidljivo nego u seriji B. Odnos koncentracije Ca^{2+} u uzorku s omjerom plave i crvene boje je bio linearan (Slika 11.). Linearnost je postigla željenu

$R^2 > 0,99$. Zbog veće koncentracije Arsenaza III u uzorcima, bilo je olakšano mjerenje što je bio jedan od razloga za kasniju seriju H s još većom koncentracijom Arsenaza III. Drugi razlog za seriju H je lakoća razrjeđenja mlijeka, pošto je mlijeko relativno heterogena otopina, a željeno je manje razrjeđenje. Prikaz koncentracije Arsenaza III, koncentracije Ca^{2+} te njihovog omjera, RGB vrijednosti crvene boje (R), plave boje (B), omjera plave i crvene boje (B/R) za otopine serije E vidi se u Tablici 10.

Tablica 10. Rezultati ispitivanja serije E.

Otopina	$c (Ca^{2+}) (\mu M)$	$c (Ars III)/c (Ca^{2+})$	R	B	B/R
E0	0	/	152,4	109,9	0,7211
E1	1,7578	17,0672	148,1	108,1	0,7299
E2	5,2733	5,6891	137,3	113,7	0,8281
E3	8,7888	3,4134	130	119,2	0,9169
E4	11,7184	2,5601	126,6	120,6	0,9526
E5	14,6480	2,0481	117	119,3	1,0197
E6	17,5776	1,7067	113,4	120,8	1,0653
E7	20,5072	1,4629	106,2	122,2	1,1507
E8	23,4368	1,2800	102	123,9	1,2147
E9	26,3664	1,1378	105,9	133,9	1,2644
E10	29,2960	1,0240	101,5	134,7	1,3271



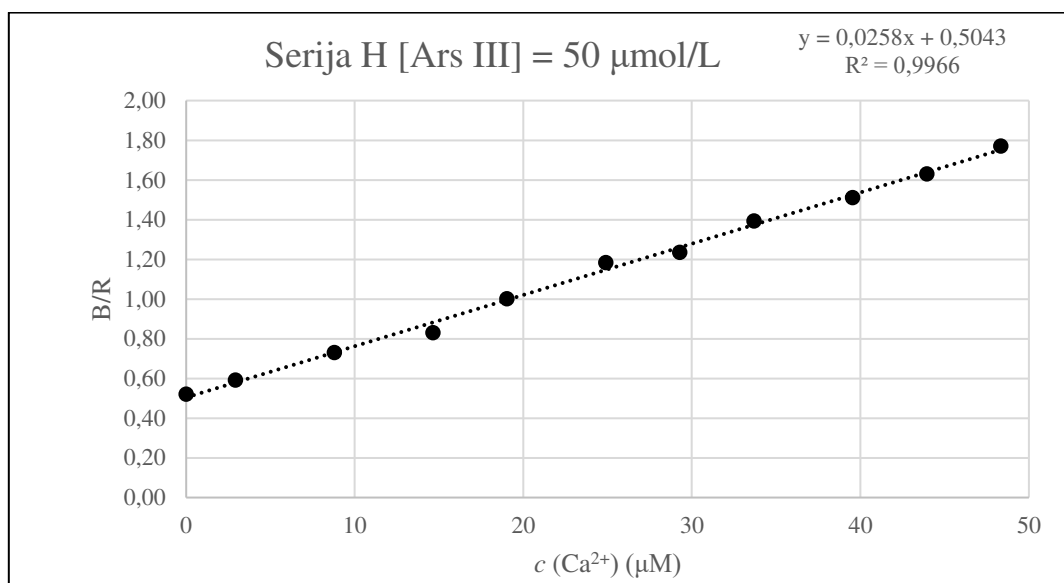
Slika 11. RGB vrijednosti B/R prema koncentraciji Ca^{2+} u uzorcima serije E

Serijske H su otopine pri sličnom omjeru $c(\text{ArsIII})/c(\text{Ca}^{2+})$ no pri još većoj koncentraciji Arsenaza III pa zato i još većoj koncentraciji Ca^{2+} . U ovoj seriji je došlo do okom odlično primjetne promjene boje povećanjem koncentracije Ca^{2+} (Slika 6.). Odnos koncentracije Ca^{2+} u uzorku s omjerom plave i crvene boje je bio linearan (Slika 12.). Linearnost je postigla željenu $R^2 > 0,99$. Zbog veće koncentracije Arsenaza III u uzorcima bilo je olakšano mjerenje. Zbog lakoće mjerenja i linearnosti u zadovoljavajućem rasponu koncentracija Ca^{2+} , pri rukovanju s uzorcima je uzet način rada kao u seriji H te je iz tog razloga serija H snimljena spektrofotometrom.

Prikaz koncentracije Arsenaza III, koncentracije Ca^{2+} te njihovog omjera, RGB vrijednosti crvene boje (R), plave boje (B), omjera plave i crvene boje (B/R) za otopine serije H vidi se u Tablici 11.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja serije H

Uzorak	$c(\text{Ca}^{2+})$	$c(\text{Ars III})/c(\text{Ca}^{2+})$	R	B	B/R
H0	0	/	132,8	69,9	0,5196
H1	2,9296	17,0672	121,5	71,8	0,5909
H2	8,7888	5,6891	109	79,5	0,7294
H3	14,6480	3,4134	102,8	85,3	0,8298
H4	19,0424	2,6257	90	90,1	1,0011
H5	24,9016	2,0079	80,2	94,9	1,1833
H6	29,2960	1,7067	72,9	90	1,2346
H7	33,6904	1,4841	66,1	92,1	1,3933
H8	39,5496	1,2642	60	90,6	1,5100
H9	43,9440	1,1378	55,7	90,8	1,6302
H10	48,3384	1,0344	52,7	93,3	1,7704

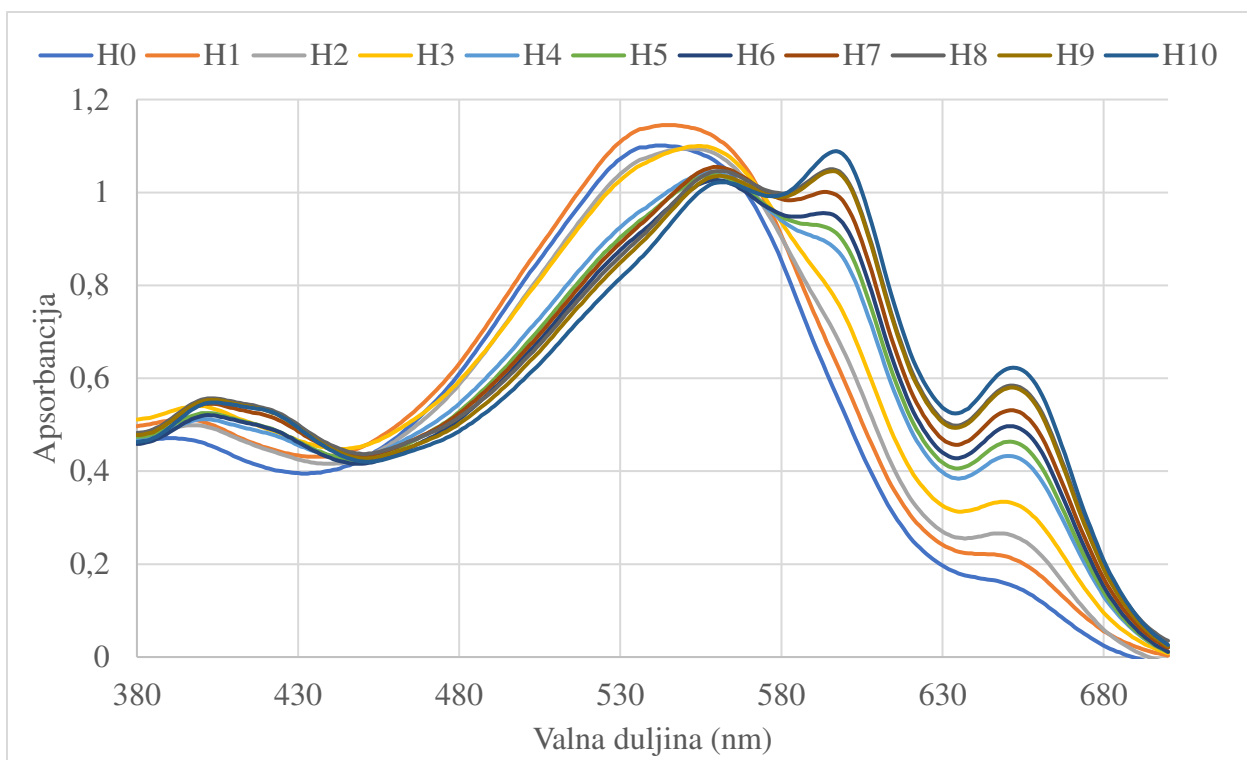


Slika 12. RGB vrijednosti B/R prema koncentraciji Ca^{2+} u uzorcima serije H

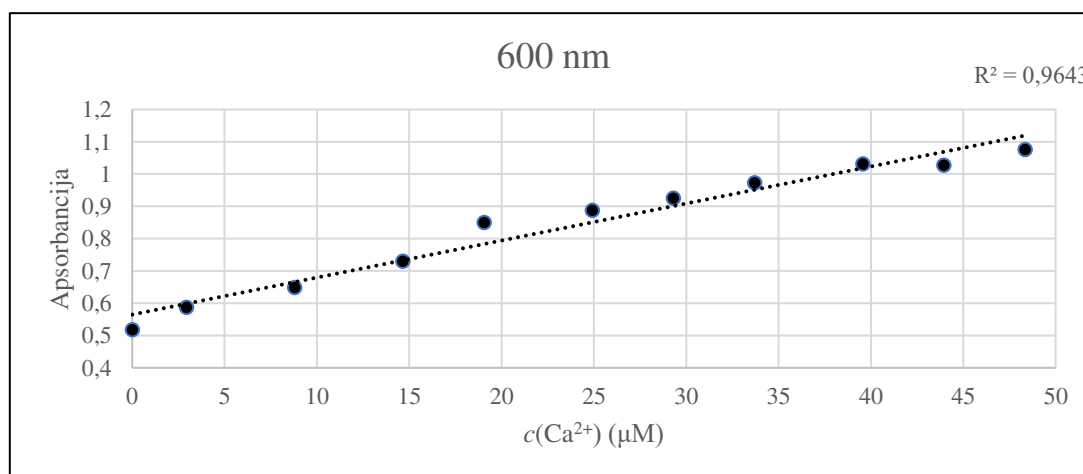
Pri utvrđivanju valjanost rezultata dobivenih analizom digitalnih fotografija uzoraka serije H, snimljen je i UV-VIS spektar koristeći spektrofotometar. Dobiveni rezultati su obrađeni u programu Excel te prikazani na Slici 13. Iz podataka se iščitavaju maksimumi na dvije valne duljine (Tablica 12.), te su za njih napravljeni grafovi ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Ca^{2+} u uzorcima pri valnim duljinama 600 nm (Slika 14.) i 650 nm (Slika 15.). Pri valnoj duljini od 600 nm postoji linearna ovisnost ali je korelacijski faktor neprihvatljiv za primjenu u kvantitativnom određivanju koncentracije kalcijevih iona. Isto vrijedi pri valnoj duljini od 650 nm. Detaljnom analizom podatka utvrđeno je da u proučavanom koncentracijskom rasponu postoje dva područja s linearnom ovisnošću koja su povezana s promjenom omjera analita i indikatora. Na Slici 16. A i B, prikazani su rezultati linearne ovisnosti u dva područja. Prvi dio je za područje većeg suviška indikatora, a drugi za područje sa stehiometrijskim omjerom 1:1. Ovakve detalje nije moguće uočiti prilikom pregleda rezultata dobivenih iz digitalnih snimaka uzoraka. Na Slika 16. prikazano je područje koncentracije Ca^{2+} iona koje je najoptimalnije za njihovo određivanje. Pri usporedbi korelacijskih faktora može se zaključiti da je metoda korištenjem pametnog telefona gotovo jednako dobra kao korištenje spektrofotometra, čija je cijena višestruka u odnosu na telefon.

Tablica 12. Prikaz apsorbancije pri valnim duljinama 600 nm i 650 nm za otopine H0 do H10

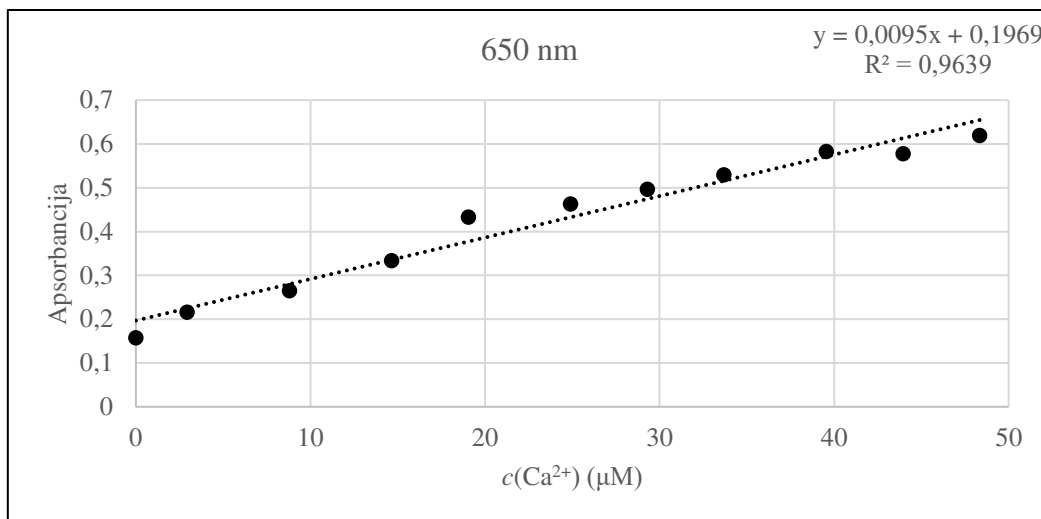
Valna duljina (nm)	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
600	0,518	0,587	0,649	0,730	0,85	0,887	0,925	0,973	1,031	1,027	1,076
650	0,158	0,216	0,265	0,334	0,433	0,463	0,497	0,530	0,583	0,578	0,620



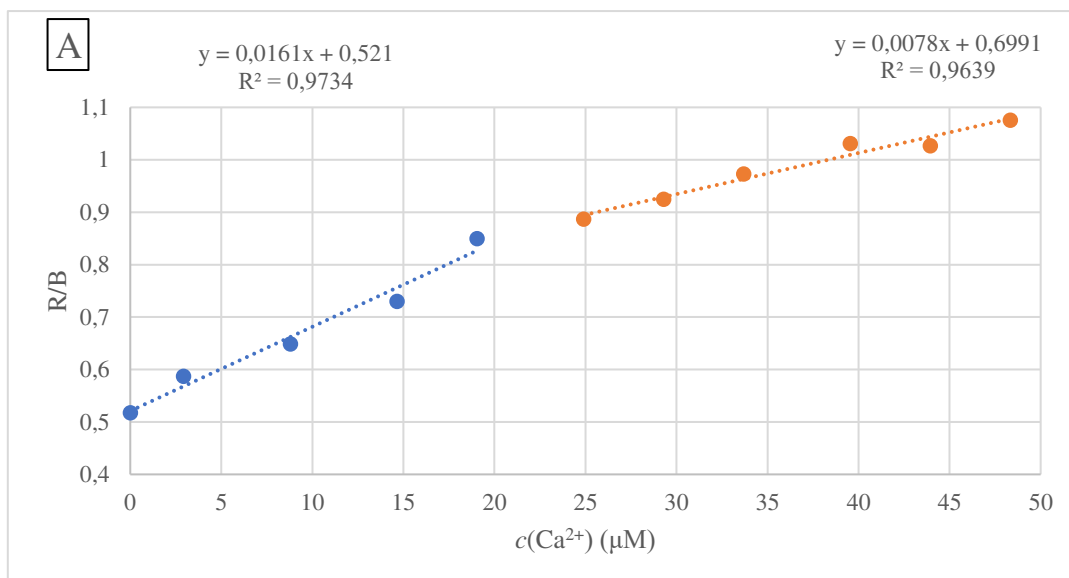
Slika 13. UV-VIS spektri serije H.

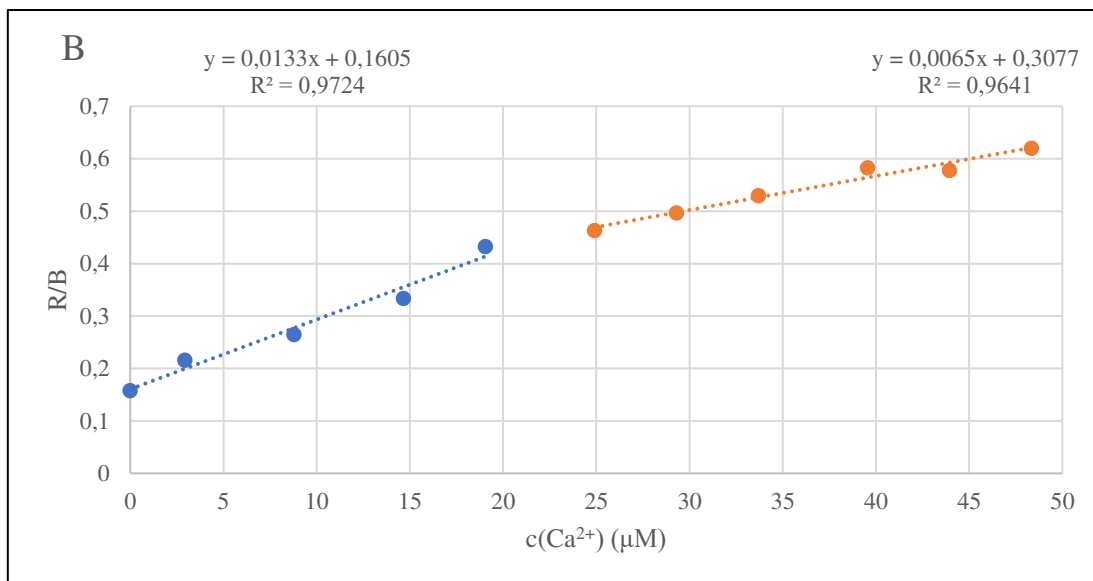


Slika 14. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji Ca^{2+} pri valnoj duljini 600 nm

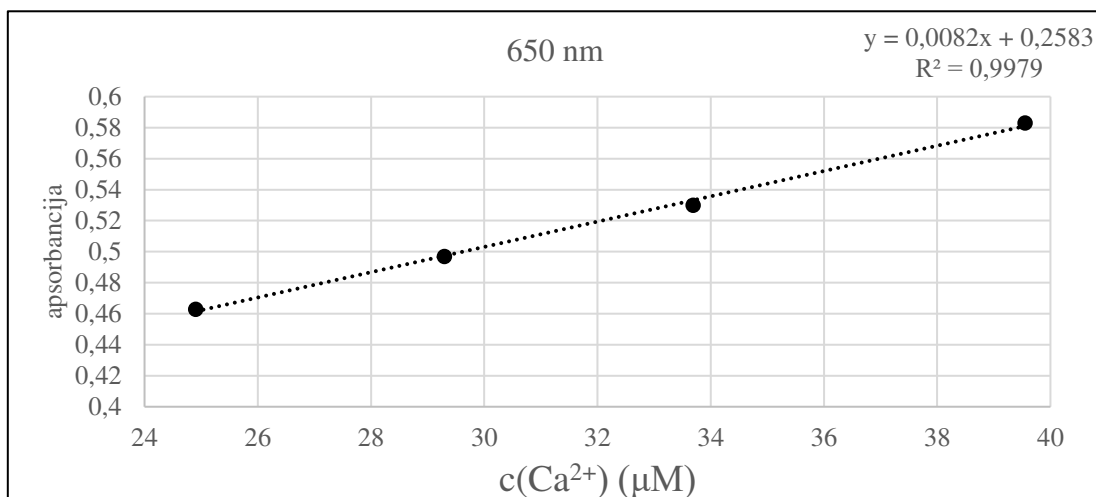


Slika 15. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji Ca^{2+} pri valnoj duljini 650nm





Slika 16. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji Ca^{2+} u dva područja omjera analita i indikatora: A. 600 nm, B. 650 nm



Slika 17. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji Ca^{2+} pri valnoj duljini 650nm za točke H5 do

H9

4.2. Određivanje ukupne koncentracije Ca^{2+} iona u uzorcima homogeniziranog mlijeka

U prvom pokušaju određivanja koncentracije kalcija u uzorku mlijeka korištena je metoda standardne adicije zbog utjecaja matriksa na odziv. Uzorak mlijeka je razrijeđen tako da odgovara koncentracijskom području optimizirane metode. Masena koncentracija kalcija u mlijeku je 1,043–1,283 g/L [38]. Na pakiranju ispitanog uzorka homogeniziranog mlijeka je deklarirano 1,2 g/L, što daje $[\text{Ca}^{2+}] = 29,94 \text{ mM}$. Mlijeko je razrijeđeno 166,66x odnosno razrijeđeno je 300 μL mlijeka s 4700 μL vode, pa zatim 500 μL te otopine u 4500 μL vode. To odgovara otprilike $[\text{Ca}^{2+}] = 179,6407 \text{ }\mu\text{M}$, no pošto se uzima 280 μL tako razrijeđenog mlijeka u uzorku volumena 5 000 μL , očekuje se $[\text{Ca}^{2+}] = 10,06 \text{ }\mu\text{M}$. Sva su se mjerenja odvijala pod zaključanim načinom rada kamere pri postavkama ISO (160), SPEED (1/1 000), WB(4 000K). Izračun koncentracije Ca^{2+} radi se iz pravca u grafu na Slici 18., metodom standardne adicije, pri čemu je x koncentracija u Ca^{2+} u uzorku mlijeka, b je presjek osi y, a okomitost pravca. Kada se uvrsti u jednadžbu 2. dobije se sljedeća jednadžba:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{\text{abs}(-b)}{a} \quad (4.)$$

gdje je:

$$b = 0,9568$$

$$a = 0,0365.$$

Izračun koncentracije Ca^{2+} s uvrštenim podatcima prikazan je u sljedećim jednadžbama:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{\text{abs}(-0,9568)}{0,0365} \quad (5.)$$

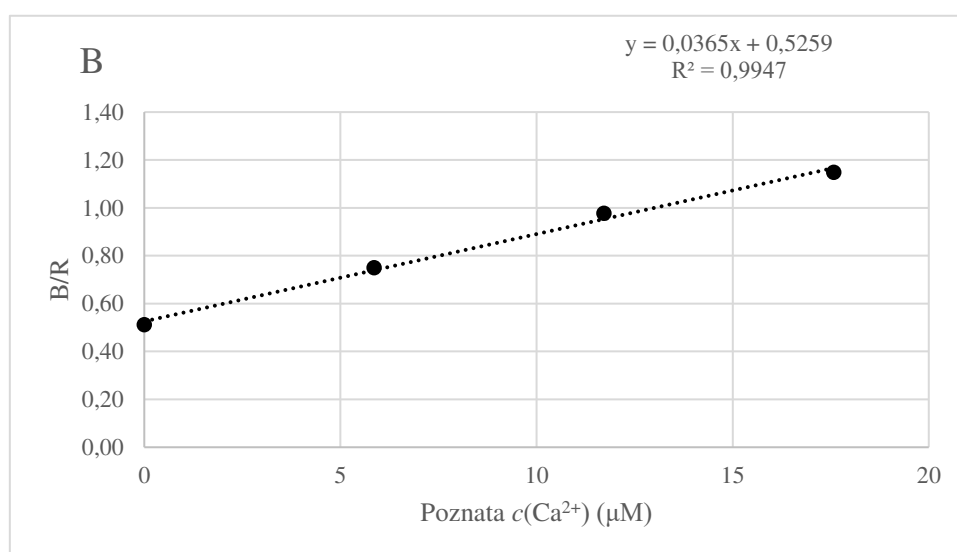
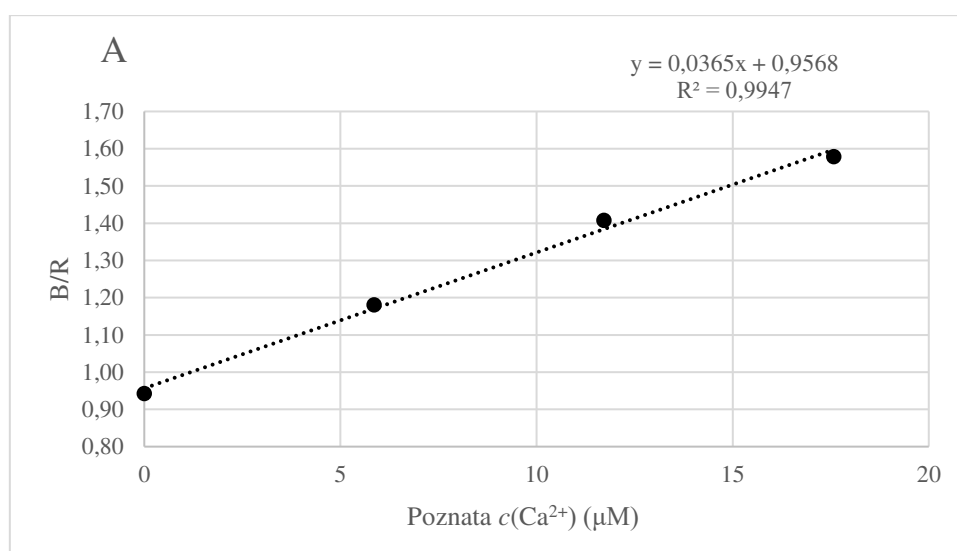
$$[\text{Ca}^{2+}] = 26,22 \text{ }\mu\text{M} \quad (6.)$$

Ova vrijednost je puno veća od očekivane (10,06 μM). Uzrok greške je najvjerojatnije reakcija Arsenazo III indikatora s protoniranim amino skupinama proteina mlijeka. Kako bi se izbjegao postupak potpune mineralizacije, koji je vremenski zahtjevan i ekološki neprihvatljiv zbog upotrebe jakih oksidirajućih kiselina, metoda je modificirana dodavanjem EDTA u uzorak radi vezivanja Ca^{2+} iona. Koncentracija EDTA u uzorku iznosila je 50 μM , dok su svi ostali dodani reagensi ostali nepromijenjeni u odnosu na prvi slučaj. Na ovaj način kvantificirana je promjena boje uzrokovana komponentama mlijeka koje EDTA ne kompleksira. Ta vrijednost B/R odbijena je od ranije dobivenih vrijednost standardnom adicijskom metodom u Tablici 13. i Tablici 14.

Na taj način pri koncentraciji dodanog $\text{Ca}^{2+} = 0$, RGB vrijednost (B/R) = 0. Na Slici 18. prikazana je linearnost pri metodi standardne adicije te jednažba pravca iz kojeg se sad, pošto je signal (B/R) modificiran, može odrediti koncentracija kalcija u uzorku.

Tablica 2. Rezultati dobiveni modificiranom metode standardne adicije za mlijeko.

Uzorak	$c(\text{Ca}^{2+})$ (μM)	R	B	B/R	Modificirani B/R
Blank	0	132,8	75,9	0,4309	0
Mlijeko	0	88,5	83,4	0,9424	0,5115
Dodatak 1	5,8592	71,1	83,9	1,1800	0,7491
Dodatak 2	11,7184	60,1	84,6	1,4077	0,9768
Dodatak 3	17,5776	54,8	86,5	1,5785	1,1476



Slika 18. Određivanje Ca^{2+} u uzorku mlijeka: A. Standardna adicija B. Modificirana standardna adicija

Izračun koncentracije Ca^{2+} iz pravca sa slike 11.B. kada se uvrsti u sljedeću jednadžbu:

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{\text{abs}(-0,5259)}{0,03645} \quad (7.)$$

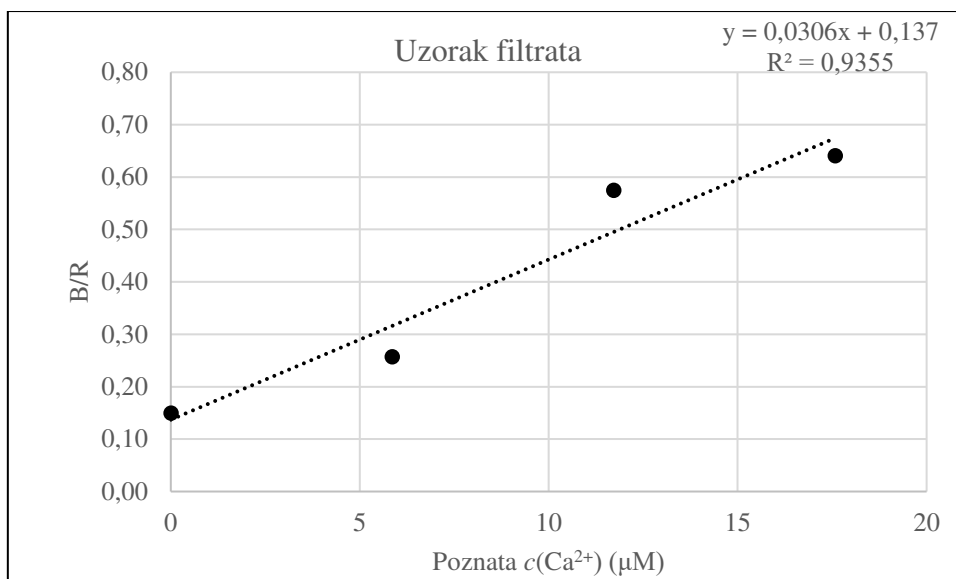
$$[\text{Ca}^{2+}] = 14,38 \mu\text{M} \quad (8.)$$

4.3. Određivanje koncentracije slobodnih Ca^{2+} iona u uzorcima homogeniziranog mlijeka

Filtrat je pripremljen miješajući mlijeko i apsolutni etanol u omjeru 1:2, u svrhu uklanjanja proteina i vezanog kalcija. Ovim načinom proteini se precipitiraju u obliku bijelog pahuljastog taloga. Odvajanje taloga provedeno je u dva koraka: prvo filtracija kroz glatki filter papir te naknadno kroz Chromafil Xtra CA-20/25 filtere za špricu od acetat celuloze promjera pora od 0,20 μm . Filtrat je proziran i bezbojan, a razrijeđen je 100 puta, pri čemu je 50 μL filtrata pomiješano s 4950 μL vode. Pretpostavljena koncentracija Ca^{2+} iona je od 70 do 130 μM [32], no pošto se uzima 500 μL tako razrijeđenog mlijeka u uzorku od 5 000 μL očekuje se koncentracija Ca^{2+} iona od 7 do 13 μM .

Tablica 3. Rezultati dobiveni modificiranom metodom standardne adicije za filtrat mlijeka

Uzorak	$c (\text{Ca}^{2+}) (\mu\text{M})$	R	B	B/R	Modificirani B/R
blank	0	176,7	75,4	0,4267	0,0000
filtrat	0	131,3	75,7	0,5765	0,1498
Dodatak 1	5,8592	114,8	78,5	0,6838	0,2571
Dodatak 2	11,7184	79,8	79,9	1,0013	0,5745
Dodatak 3	17,5776	78,3	83,6	1,0677	0,6410



Slika 19. Modificirana standardna adicija Ca^{2+} s uzorkom filtrata mlijeka

Za uzorke filtrata modificiranom standardnom adicijom (Slika 19.) pokazuje $R^2 < 0,99$, stoga nije zadovoljena linearnost te nije moguće pouzdano odrediti koncentraciju analita.

5. Zaključak

Za potrebe malih prerađivača mlijeka ili proizvođača zrelih sireva kojima je potrebna informacija o ukupnoj koncentraciji Ca^{2+} u mlijeku kako bi se nadomjestio nedostatak dodatkom CaCl_2 i osigurala kontinuirana kvaliteta proizvoda, potreban je razvoj jednostavne, jeftine analitičke metode za određivanje koncentracije Ca^{2+} . Kao rezultat ovog diplomskog rada koncentracija Arsenazo III kompleksometrijskog indikatora za određivanje koncentracije Ca^{2+} iona je optimizirana, te je dokazano da se obradom podataka digitalne fotografije uzorka promjena boje može kvantitativno mjeriti za potrebe kemijske analize.

Ekološki pritisak kemijskih analiza pokušao se smanjiti na način da se izbjegne potpuna mineralizacija uzoraka jakim oksidativnim kiselinama, pa se metoda pripreme uzorka pokušala pojednostaviti razrjeđivanjem i maskiranjem. Na ovaj način dobiveni su rezultati koji se ne podudaraju s rezultatima određenim standardnim analitičkim metodama koje se koriste u velikim industrijskim postrojenjima za preradu mlijeka. Da bi optimizirana kolorimetrijska metoda bila primjenjiva u proizvodnji domaćih sireva, potrebno je razviti i metodu pripreme uzorka. U tu svrhu, za buduća istraživanja predlažu se ispitivanja kompleksometrijskih indikatora s većom selektivnošću za Ca^{2+} ione i optimizacija maskiranja interferenata optimizacijom pH vrijednosti, koncentracije EDTA, te drugih otapala za uklanjanje proteina iz uzoraka mlijeka.

6. Literatura

- [1] EFSA Panel on Dietetic Products, Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of calcium. *EFSA J.* **2012**, 10, 7, 2814.
- [2] P. F. Fox, P. L. H. Mcsweeney, K. Firm, *Dairy chemistry and biochemistry*, London, New York: Blackie Academic & Professional, **1998**, p. 243-250.
- [3] W. Chen, Y. Yao, T. Chen, W. Shen, S. Tang, H. K. Lee, Application of smartphone-based spectroscopy to biosample analysis: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2021**, 172, 112788.
- [4] J. L. D. Nelis, A. S. Tsagkaris, M. J. Dillon, J. Hajslova, C. T. Elliott, Smartphone-based optical assays in the food safety field. *TrAC.* **2020**, 129, 115934.
- [5] M. J. Kangas, R. M. Burks, J. Atwater, R. M. Lukowicz, P. Williams, A. E. Holmes, Colorimetric Sensor Arrays for the Detection and Identification of Chemical Weapons and Explosives. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, 47, 2, 138–153.
- [6] J. Gresti, M. Bugaut, C. Maniongui, and J. Bezar, Composition of Molecular Species of Triacylglycerols in Bovine Milk Fat. *J. Dairy Sci.* **1993**, 76, 7, 1850–1869.
- [7] O. R. Fennema, *Food chemistry*, New York Dekker, **1996**.
- [8] E. Muehlhoff, A. Bennett, and D. McMahon, *Milk and milk products in human nutrition*, Rome: Food And Agriculture Organization Of The United Nations, **2013**, p. 112.
- [9] C. Holt, J. A. Carver, H. Ecroyd, D. C. Thorn, Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *J. Dairy Sci.*, **2013**, 96, 10, 6127–6146.
- [10] R. Atra, G. Vatai, E. Bekassy-Molnar, A. Balint, Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *J. Food Eng.* **2005**, 67, 3, 325–332.
- [11] W. Rattray P. Jelen, Thermal stability of skim milk with protein content standardized by the addition of ultrafiltration permeates. *Int. Dairy J.* **1996**, 6, 2, 157–170.
- [12] J. L. Linzell, Mechanism of Secretion of the Aqueous Phase of Milk. *J. Dairy Sci.* **1972**, 55, 9.
- [13] N. F. Krebs, Bioavailability of Dietary Supplements and Impact of Physiologic State: Infants, Children and Adolescents. *J. Nutr.* **2001**, 131, 4, 1351S1354S.

- [14] R. E. Black, S. M. Williams, I. E. Jones, and A. Goulding, Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 76, 3, 675–680.
- [15] Marie-Elssa Morency, Catherine S Birken, Gerald Lebovic, Yang Chen, Mary L'Abb', Grace J Lee, Jonathon L Maguire, Association between noncow milk beverage consumption and childhood height. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, 106, 2, 597–602.
- [16] S. Murphy, K-T. Khaw, H. May, J. E. Compston, Milk consumption and bone mineral density in middle aged and elderly women. *BMJ.* **1994**, 308, 6934, 939–941.
- [17] C. Byrd-Bredbenner, Gaile Moe, D. Beshgetoor, J. R. Berning, E. Al, *Wardlaw's perspectives in nutrition*. Boston: McGraw-Hill, Cop, **2009**.
- [18] M. H. Tunick, Calcium in Dairy Products. *J. Dairy Sci.* **1987**, 70, 11, 2429–2438.
- [19] E. Ayala-Bribiesca, M. Lussier, D. Chabot, S. L. Turgeon, M. Britten, Effect of calcium enrichment of Cheddar cheese on its structure, in vitro digestion and lipid bioaccessibility. *Int. Dairy J.* **2016**, 53, 1–9.
- [20] A. J. Pastorino, N. P. Ricks, C. L. Hansen, D. J. McMahon, Effect of Calcium and Water Injection on Structure-Function Relationships of Cheese. *J. Dairy Sci.* **2003**, 86, 1, 105–113.
- [21] C. E. Housecroft E. C. Constable, *Chemistry: an integrated approach*, Harlow Longman, **2006**.
- [22] D. A. Skoog, J. F. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed. Boston, Mass.: Cengage Learning, **2007**, p. 217-223.
- [23] S. M. Nelms, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, CRC Press, **2005**, p. 243-244, 412.
- [24] C. S. Kira and V. A. Maihara, Determination of major and minor elements in dairy products through inductively coupled plasma optical emission spectrometry after wet partial digestion and neutron activation analysis. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 1, 390–395.
- [25] S. J. Hill, *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [26] M. J. LEWIS, The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. *Int. J. Dairy Technol.* **2010**, 64, 1, 1–13.
- [27] A. L. Bard, *Electrochemical methods fundamentals and applications*, New York: John Wiley & Sons, **2001**, p. 79-81.

- [28] A. I. Vogel, G. H. Jeffery, Arthur Israel Vogel, *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical analysis*, 5th ed. Harlow, Essex, England: Longman Scientific & Technical; New York, **1989**, p. 325.
- [29] N. N. Basargin, V. M. Ivanov, V. V. Kuznetsov, A. V. Mikhailova, 40 years since the discovery of the arsenazo III reagent. *J. Anal. Chem.* **2000**, 55, 3, 204–210.
- [30] P. L. Dorogi, U. Santarius, E. Neumann, Arsenazo I and tetramethylmurexide as optical calcium indicators. *Anal. Biochem.* **1982**, 124, 1, 27–36.
- [31] R. Choudhury and Textile Institute, *Principles of colour appearance and measurement. Volume 1, Object appearance, colour perception and instrumental measurement*, Amsterdam: The Textile Institute In Association With Elsevier/Woodhead Publishing, Manchester, England, **2014**.
- [32] M. B. Petrovich, V. R. A. Filho, J. A. G. Neto, Direct determination of calcium in milk by atomic absorption spectrometry using flow-injection analysis. *Ecletica Quim. J.* **2007**, 32, 3, 25–30.
- [33] Perkin-Elmer, Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. The Perkin-Elmer Corporation.
URL: https://www1.lasalle.edu/~prushan/Instrumental%20Analysis_files/AA-Perkin%20Elmer%20guide%20to%20all!.pdf (11. rujna.2024)
- [34] S. Lamothe M. Britten, Coagulation and proteolysis of high-protein milks in the gastric environment, *J. Dairy Sci.* **2023**, 106, 8, 5242–5252.
- [35] X. Wang, A. Ye, Q. Lin, J. Han, H. Singh, Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *J. Dairy Sci.* **2018**, 101, 8, 6842–6852.
- [36] Randox Laboratories, Calcium - Colorimetric Method [CA 7130], "RX Series, Rev. 28 Jun 23. URL: <https://www.labcarecolombia.com/document/download/1983/84a9e42a-7207-4801-af51-54e48d6fda36/3783> (6.rujna.2024.)
- [37] E. Rowatt R. J. P. Williams, The interaction of cations with the dye arsenazo III. *Biochem. J.* **1989**, 259, 1, 295–298.
- [38] F. Gaucheron, The minerals of milk. *Reprod. Nutr. Dev.* **2005**, 45, 4, 473–483.

Literatura slika:

Slika 1. Nacrtna u programu ChemSketch

URL: <https://www.fishersci.pt/shop/products/arsenazo-iii-disodium-salt-thermo-scientific/11443794> (29.kolovoza.2024.)

Slika 2. Nacrtana u programu ChemSketch

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arsenazo-I#section=2D-Structure>
(29.kolovoza.2024.).

Slika 3. Nacrtana u programu ChemSketch

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arsenazo-II#section=2D-Structure>
(29.kolovoza.2024.)