

Određivanje kvalitete hrane

Kirch - Leto, Annabella

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:484769>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni preddiplomski studij kemije

Annabella Kirch-Leto

Određivanje kvalitete hrane

(Determination of food quality)

Završni rad

Mentorica: Izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Osijek, 2021.

Sažetak

Određivanje kvalitete hrane je vrlo važan postupak pri kojemu se upotrebljavaju razne analitičke metode u svrhu prikupljanja podataka o udjelima pojedinih elemenata u hrani, njezinoj sigurnosti, hranjivoj vrijednosti te ispitivanja organoleptičkih svojstava. Najčešće upotrebljavane metode kemijske analize hrane su kromatografske, spektrofotometrijske, volumetrijske, gravimetrijske, taložne i destilacijske metode.

Cilj ovog rada bio je istražiti i opisati metode koje se upotrebljavaju prilikom analize hrane te otkriti zašto se hrana uopće mora provjeravati, što su to organoleptička svojstva te analizira li se hrana samo pomoću instrumenata ili i na druge načine, također razjasniti što se sve nalazi u hrani i kako određene komponente djeluju na hranu te kakav je utjecaj mikroorganizama. Osim prethodno navedenog, spomenute su i zakonske regulacije vezane za dodatke hrani te potrebe tržišta vezane za hranu koja se prodaje u trgovinama.

Ključne riječi: kvaliteta hrane, sigurnost hrane, analiza hrane, aditivi, organoleptička svojstva

Abstract

Determination of food quality is a very important procedure in which various analytical methods are used for the purpose of collecting data on the proportions of individual elements in food, its safety, nutritional value and testing of organoleptic properties. The most commonly used methods of chemical analysis of food are chromatographic, spectrophotometric, volumetric, gravimetric, precipitation and distillation methods.

The aim of this paper was to explore and describe the methods used in food analysis and to find out why food must be checked at all, what are the organoleptic properties and whether food is analyzed only with instruments or in other ways, also to clarify what kind of compounds can be found in food and how certain components affect food, also the impact of microorganisms. In addition to the above, in the paper is also mentioned the topic of legal regulations related to food additives and the needs of the market related to food that is sold in supermarkets.

Key words: food quality, food safety, food analysis, additives, organoleptic properties

SADRŽAJ

Sažetak.....	2
Abstract	3
1. UVOD	1
2. ISPITIVANJE SIGURNOSTI I KONTROLA KVALITETE HRANE	2
3. ISPITIVANJE SVOJSTAVA HRANE	5
3.1. Fizikalno-kemijska svojstva hrane	5
4. KEMIJSKE I SENZORSKE METODE ANALIZE HRANE	7
4.1. Plinska kromatografija i olfaktometrija.....	7
4.2. Kromatografija na papiru	8
4.3. Tekućinska kromatografija	10
4.4. Spektrofotometrija	11
5. PRIPREMANJE I OBRADA UZORAKA ZA ANALIZU	14
6. ODREĐIVANJE VODE.....	15
6.1. Sušenje.....	15
6.2. Destilacija	16
6.3. Ostale metode određivanja vode	16
7. DOKAZIVANJE TEŠKIH METALA	18
8. ODREĐIVANJE PROTEINA	20
9. ODREĐIVANJE MASTI	22
10. ODREĐIVANJE UGLJIKOHIDRATA	24
11. ADITIVI	27
12. ZAKLJUČAK.....	30
13. LITERATURA	32

1. UVOD

Analiza hrane je disciplina koja se bavi razvijanjem novih metoda i primjenjivanjem postojećih analitičkih metoda u svrhu istraživanja hrane, odnosno njezinih svojstava i svojstava njezinih komponenata. Analiza nam pruža informacije o karakteristikama hrane kao što su njezina fizikalno kemijska svojstva, struktura, reaktivnost i slično. Upravo te informacije su ključne kako bi razumjeli i istražili svojstva hrane i njezinih komponenata te na taj način osigurali ekonomski isplativu proizvodnju hrane koja je će prije svega biti kvalitetna i sigurna za konzumaciju, nutritivna i zdrava. U ovom radu fokus će biti na teme kako odabrati pogodnu analitičku metodu da bi se ispitala kvaliteta hrane i koje od tih metoda se najčešće koriste. Vlada svake države postavlja odredbe i preporuke koje pomažu u regulaciji takvih metoda i pojedinih komponenata u hrani. Takve odredbe se postavljaju kako bi se održao određeni standard i da bi potrošači hrane bili sigurni da će proizvođači dostaviti prije svega kvalitetne i zdrave namirnice na njihov stol. Također preporuke i zakoni služe tome kako bi se potrošači mogli informirati o nutritivnim vrijednostima hrane te njezinim svojstvima i sami odlučiti na koji način se žele hraniti i kakav tip prehrane im najviše odgovara. Informiranost o kvaliteti hrane je vrlo važna kako bi spriječili proizvodnju nekvalitetne hrane i omogućili sebi i drugima konzumaciju najboljih mogućih proizvoda u pogledu svakodnevne prehrane. Postoje mnogobrojni državni instituti koji se bave regulacijama kvalitete, a najpoznatija je Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration* ili skraćeno FDA) sa sjedištem u Sjedinjenim Američkim Državama. U Europi zakone i odredbe regulira Europska komisija dok je na razini Hrvatske za to zadužena Hrvatska agencija za hranu.

2. ISPITIVANJE SIGURNOSTI I KONTROLA KVALITETE HRANE

Jedna od najvažnijih stavki u analizi hrani je ispitivanje sigurnosti. Zašto je uopće potrebno ispitati sigurnost hrane? Upravo iz razloga kako se potrošači hrane ili njezini proizvođači ne bi našli u neugodnoj situaciji u kojoj bi konzumirali ili kao proizvođači hrane proizvodili toksičnu hranu koja može biti štetna za ljudsko zdravlje. Nesigurna hrana može sadržavati razne mikroorganizme koji bi mogli narušiti ljudsko zdravlje, najčešći primjeri su lat. *Salmonela spp.*; *Campylobacter spp.*; *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli 0157*. S obzirom da se bakterije vrlo brzo razmnožavaju one predstavljaju vrlo velik problem ako se nađu u hrani jer su istraživanja pokazala da se od jedne bakterije za 8 sati u pogodnim uvjetima može razviti nekoliko milijuna novih jedinki, a za 12 sati i do nekoliko milijardi. Bakterije se gotovo uvijek razmnožavaju u toplim i vlažnim uvjetima, zato se hrana i drži u hladnjaku kako bi se spriječilo i usporilo njihovo razmnožavanje. S obzirom na tako veliku količinu bakterija koja se može razmnožiti u vrlo kratkom vremenu dovoljna je jako mala količina hrane da bi se osoba otrovala.

Prva u nizu najpoznatijih bakterija prisutnih u hrani je *Salmonela spp.* koja je prisutna u mliječnim proizvodima, mesu i jajima i najčešći je uzročnik trovanja hranom u Hrvatskoj [1]. Ona je sama po sebi već prisutna u namirnicama, ali jedinke bakterije prežive u hrani samo u slučaju ako hrana nije termički pravilno obrađena. Bolest koja je uzrokovana ovom bakterijom je zarazna i prelazi s oboljelog na zdravu osobu te se zove salmoneloza, a širenje zaraze se može izbjeći redovitim pranjem ruku.

Campylobacter spp. je vrsta bakterije koja je prisutna u nepasteriziranom mlijeku i mesu te se lako razmnožava u hrani i tijelu domaćina, stoga već relativno mali broj bakterija može prouzrokovati bolest koja je popraćena dijarejom i jakim grčevima u trbuhu.

Bakterija *Clostridium perfringens* je prisutna u mesu i njegovim prerađevinama te u tlu, a može se naći u svim vrstama hrane. Trovanje je uzrokovano kuhanjem velikih količina hrane koja dugo stoji na sobnoj temperaturi i za nju je specifično da stvarajući spore u nepovoljnim uvjetima može preživjeti termičku obradu hrane ako temperatura ne prelazi 60-75°C.

Listeria monocytogenes je prisutna u malim količinama gotovo u svakoj vrsti hrane, dok se u većim količinama nalazi u siru, pašteti, mesu i ribljim proizvodima, bolest je jako opasna i naziva se listerioza, a pogođene skupine su kronični bolesnici i trudnice, stariji ljudi i novorođenčad. Aktivira se u organizmu kad se konzumira hrana koja sadrži veliki broj bakterija u sebi, a s obzirom da može imati i smrtne posljedice, trudnicama se savjetuje da

izbjegavaju određenu hranu u trudnoći koja bi mogla sadržavati bakteriju kako ne bi došlo do pobačaja.

Jedna od najpoznatijih bakterija prisutnih u ljudskom organizmu naziva se *Escherichia coli* i većina njezinih vrsta je potpuno bezopasna i već sama po sebi stanovnik našeg probavnog sustava. Vrste koje sadrže verocitotoksin (VTEC) uzrokuju razne bolesti koje imaju vrlo ozbiljne posljedice kao što su anemija, neurološki problemi i otkazivanje bubrega, ali može imati i smrtne posljedice, a prepoznaje se po simptomima kao što su grčevi i krvava dijareja te se prenosi u kontaktu sa životinjama ili njihovim izmetom i kontaktom sa zaraženom osobom [1].

Osim mikroorganizama problem u hrani predstavljaju i strani predmeti koji se mogu naći u hrani npr. metal, drvo, plastika, insekti i slično te toksične kemikalije. Kako bi se zadržao određeni standard, kemijska analiza hrane mora biti vrlo precizna i instrumenti moraju mjeriti vrlo male koncentracije ispitivane tvari i biti što preciznije. U industriji hrane konkurencija je jako velika i proizvođači stalno rade na tome da se napravi novi proizvod koji će biti kvalitetniji, ali jeftiniji od konkurentnog te poželjniji. Taj proizvod naravno mora biti siguran i prije svega hranjiv, stoga se analiza mora vršiti prije i poslije te tokom proizvodnog procesa hrane. Potrošači su naviknuti da su proizvodi uglavnom isti ili slični proizvodu kojeg su do sada kupovali. Veliki izazov je stavljen pred proizvođače u smislu da moraju napraviti isti ili gotovo isti finalni proizvod od početnih namirnica koje mogu varirati s vremena na vrijeme u kvaliteti s obzirom na razne uvjete poput cijene, dostupnost itd. Potrebne su im informacije kako bi analizirali početne sirovine, a te informacije su dostupne kroz istraživanje i analizu, također je potreban nadzor hrane i sirovina tokom procesa kako bi se proizvođači držali propisanih normi i standarda. Ukoliko se pojavi bilo kakav problem potrebno je na vrijeme reagirati. Sve sirovine moraju proći strogu karakterizaciju te se rade određena mjerenja kako bi se utvrdila svojstva pojedinih komponenata. Ako sirovine ne zadovoljavaju minimalne standarde, može doći do promjena i u finalnom proizvodu, međutim ako su poznata svojstva polaznih sirovih materijala, moguće je mijenjati i regulirati uvjete proizvodnje.

Idealan primjer je krumpir, gdje boja čipsa koji je finalni proizvod ovisi o koncentraciji reducirajućih šećera u krumpiru. Što je veća koncentracija krumpir je više smeđe boje i upravo zato je potrebno imati odgovarajuću analitičku metodu koja može precizno odrediti koncentraciju reducirajućeg šećera kako bi se prilagodili uvjeti proizvodnje da bi krajnji

proizvod imao točno onu boju koja je poželjna. Kako bi izbjegli gubitke proizvoda, a samim time i vremena, ali i novca poželjno je raditi analizu tokom samog procesa proizvodnje, gdje se odstupanja od normiranih vrijednosti mogu brzo regulirati. Na taj način se primjerice može spriječiti bacanje materijala ukoliko dođe do problema. Za primjer se može uzeti proizvodnju čokolade s prevelikim udjelom kakao praha u odnosu na željeni postotak. Treba prvo detektirati anomalije i proizvode koji ne odgovaraju standardima, a takvi se proizvodi često šalju na daljnje analize i na kraju bacaju što dovodi do gubitaka. Da bi ih izbjegli, danas se upotrebljavaju instrumenti koji odmah detektiraju problem i brzo izvode mjerenja bez da se upotrebljavaju invazivne i destruktivne metode i najčešće su automatizirani. Krajnji proizvod mora se također analizirati kako bi se provjerilo odgovara li on normama i regulacijama koje su strogo propisane za svaku državu i na taj način potvrditi da je proizvod siguran za konzumaciju i da je visoke kvalitete, ali i da će zadržati sva potrebna svojstva do trenutka kada će biti spreman za konzumaciju [2]. HACCAP (eng. *Hazard Analysis and Critical Control Point*) je proces analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka i njegova je uloga prevenirati opasnosti i osigurati hranu koja je sigurna za konzumiranje. Zakon o hrani NN 46/07 kaže kako svi koji posluju s hranom moraju provoditi redovite kontrole higijenskih uvjeta u različitim fazama proizvodnje hrane te njezine distribucije ili prerade, a isti ih zakon obvezuje da se kontrola vrši po načelu HACCP-a [3]. Ovaj sustav je napravljen u svrhu da se pronađu kritične točke u procesu proizvodnje i prerade hrane koje bi mogle uzrokovati potencijalnu opasnost ili same namirnice koje mogu biti štetne. Svaki proizvođač mora imati potrebnu dokumentaciju o analizama i njezine rezultate. Ovaj sustav je razvijen kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta, ali nije jedini sustav na tržištu stoga se uz njega koriste i mnogi drugi sustavi. Kako bi proizvođači ostali konkurentni, nastoje pratiti trendove i upravo iz tog razloga često zapošljavaju znanstvenike koji rade na istraživanjima novih proizvodnih procesa i nastoje razumjeti na koji način određeni proces ili namirnica utječe na krajnji produkt. Osnovna istraživanja se temelje na ispitivanju fizikalnih svojstava namirnica, strukture i slično, te promatranju strukture i interakcija među molekulama te kako okolina utječe na te interakcije. Primjerice kako uvjeti poput temperature, vlažnosti zraka, tlaka, mehaničkog miješanja i sličnih uvjeta utječu na hranu.

3. ISPITIVANJE SVOJSTAVA HRANE

Kompozicija hrane je jedno od najvažnijih svojstava jer utječe na sigurnost hrane za konzumaciju, ali i na ostala svojstva kao što su boja, okus, kvarljivost i mnoga druga fizikalno-kemijska svojstva. Hrana je uglavnom kompleks sastavljen od mnogo različitih sastavnica i stoga je njezina kompozicija specifična za svaki proizvod. Stoga se kemijske analize mogu provoditi na razini samih atoma, kako bi se primjerice saznao udio kisika u proizvodu, molekula kao što su voda ili primjerice saharoza ili točno određenih supstanci poput brašna, mlijeka i slično. Vlada svake države regulira na koji način se obilježava sastav na proizvodu i na koji način se prikazuju koncentracije pojedinih komponenata u hrani. Poznato je kako određeni spojevi s obzirom na raspored atoma u molekuli mogu imati svojstvo otrova ili lijeka iako se može raditi o istoj molekulskoj formuli, isti je slučaj i sa hranom. Pretpostavka je da će se promijeniti naravno i sama kvaliteta proizvoda s obzirom na razmještaj atoma. Struktura hrane se može proučavati na mnogo razina poput one molekulske u rasponu od 1 do 100 nanometara gdje se proučava trodimenzionalna struktura spoja te interakcije među molekulama. Osim strukture samog produkta proučava se i struktura njegovih komponenata. Druga razina u nizu je ona mikroskopska u kojoj su čestice veličine od 10 nanometara do 100 mikrometara. Ona se ne može vidjeti golim okom i predstavlja nakupine molekula koje čine fazu. Tu je moguće vidjeti kristalnu strukturu, nakupine proteina, emulzije, molekule zraka i slično. Makroskopska struktura predstavlja svaku strukturu čije su čestice veličine preko 100 mikrometara i njih je moguće vidjeti golim okom. Primjer takve strukture bila bi kocka šećera, čokoladne mrvice, zobene pahuljice itd. Analitičke metode pomažu pri razvoju novih proizvoda s boljim svojstvima, ali i pri analizi i istraživanju strukturne razine.

3.1. Fizikalno-kemijska svojstva hrane

Fizikalno-kemijska svojstva hrane izravno utječu na samu kvalitetu hrane, a samim time određuju kako hrana reagira tokom procesa proizvodnje i na koji način će se ona skladištiti, ali i kakva će hrana biti u dodiru s ljudskim osjetilima. Optička svojstva hrane pokazuju kakve su interakcije hrane u dodiru s elektromagnetskim zračenjem unutar vidljivog dijela spektra, odnosno dolazi li do optičkih pojava kao što su refleksija, refrakcija, raspršenje svjetlosti i slično. Bijela boja punomasnog mlijeka daje izgled kao da je intenzitet bijele boje puno jači u odnosu na ono koje nije punomasno jer se svjetlost na površini punomasnog mlijeka više rasprši zbog prisutnih kapljica masti. Reološka svojstva ili promjene su također

jedno od bitnih svojstava koje se analizira, a mogu se općenito opisati kao promjene koje su nastale uslijed tečenja materije ili deformacijom [4]. Stabilnost hrane je također jedno od važnijih svojstava koje se promatra jer hrana koja je sigurna ne smije podlijegati takvim promjenama koje će djelomično ili u potpunosti promijeniti njezina svojstva u danom vremenu. Takve promjene mogu biti biološkog karaktera, fizikalnog ili kemijskog. Biološke promjene su naravno one koje uključuju razmnožavanje raznih mikroorganizama, primjerice povećanje broja bakterija ili gljivica u hrani. Kemijske promjene su promjene na razini samih molekula, tj. dolazi do kemijskih ili biokemijskih reakcija uslijed kojih može doći i do promjene boje npr. stajanjem na zraku jabuka će u oksidirati i posmeđiti. Okus je svojstvo koje nastaje interakcijom molekula u dodiru s receptorima u ljudskom organizmu također kao i miris. S obzirom na ove činjenice može se zaključiti kako su fizikalno-kemijska svojstva hrane i njezinih komponenata jako važan segment i utječu na svojstva krajnjeg proizvoda, također da su ista vrlo promjenjiva i da su analitičke metode potrebne kako bi mogli napraviti što bolji produkt i osigurati kvalitetu i uvjete koji su potrebni da bi produkt imao točno ona fizikalno-kemijska svojstva koja odgovaraju traženim standardima.

4. KEMIJSKE I SENZORSKE METODE ANALIZE HRANE

Kemijske metode se upotrebljavaju za analizu hrane kako bi odredile udjele sastojaka u pojedinoj hrani, udio stranih tijela, mikroorganizama i bioaktivnih tvari, toksina, aditiva i drugih tvari. Pri odabiru pogodne metode kemijske analize potrebno je uzeti u obzir točnost i preciznost metode, mjerno područje, selektivnost, granicu detekcije te način pripreve uzoraka. Instrumentalne metode se najčešće upotrebljavaju kako bi se provjerila fizikalno-kemijska svojstva hrane te se one upotrebljavaju u kombinaciji s ljudskim osjetilima kako bi se ispitala organoleptička svojstva. Takav način analize naziva se još i senzorska analiza. Ona je proces u kojem se za analizu koriste ljudska osjetila i često se koristila u prošlosti. Organoleptička svojstva su upravo ona svojstva koja ispituju prehrambeni tehnolozi, poput izgleda, okusa, boje, mirisa, no također se u njih ubrajaju i svojstva poput viskoznosti, plastičnosti, hrskavosti, tvrdoće i čvrstoće i slično te se ona ispituju opipom ili jezikom [5].

4.1. Plinska kromatografija i olfaktometrija

Plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC) je metoda kojom se mogu odvajati i analizirati spojevi koji se prilikom isparavanja ne raspadaju. Najčešće se upotrebljava kako bi se ispitala čistoća smjese ili za odjeljivanje određenih sastojaka iz smjese, primjerice zaslađivača u soku od jabuke. U plinskoj kromatografiji otopina analita se ubrizgava u kolonu u kojoj se nalazi mobilna faza odnosno inertni plin nosač. Stacionarnu fazu u koloni čini polimerski mikroskopski sloj ili tekućina na inertnoj krutoj podlozi. Uzorak smjese se upari tako da ne dolazi do raspada analita te dolazi do eluiranja odnosno protoka plinske faze koja je mobilna i čije je međudjelovanje s uzorkom zanemarivo. Jedina funkcija plina nosača je da on prenosi analit kroz kolonu i to su najčešće helij, dušik i vodik [6]. Sprega plinske kromatografije i olfaktometrije (eng. *gas chromatography-olfactometry*, OGC) je kombinacija senzorske i analitičke metode kemijske analize koja kao detektor upotrebljava ljudski nos ili električni nos uz standardni detektor za analizu. Električni nos se sastoji od selektivnih elektrokemijskih senzora koji su osjetljivi na određene arome i mirise i najčešće se koristi u prehrambenoj industriji za analizu aromatičnih komponenata [7]. Pomoću ove metode analize moguće je odijeliti određeni traženi miris iz kompleksne smjese. Prehrambeni tehnolog može pomoću njuha detektirati prisutnost određenog mirisa iz aktivnih tvari u eluatu koje se nalaze u posebnom dijelu uređaja za analizu koji se naziva mirisni otvor (eng. *odor port*, ODP) koji je izravno spojen na standardni detektor koji je najčešće foto-ionizacijski, plamen-ionizacijski ili detektor termalne provodljivosti.

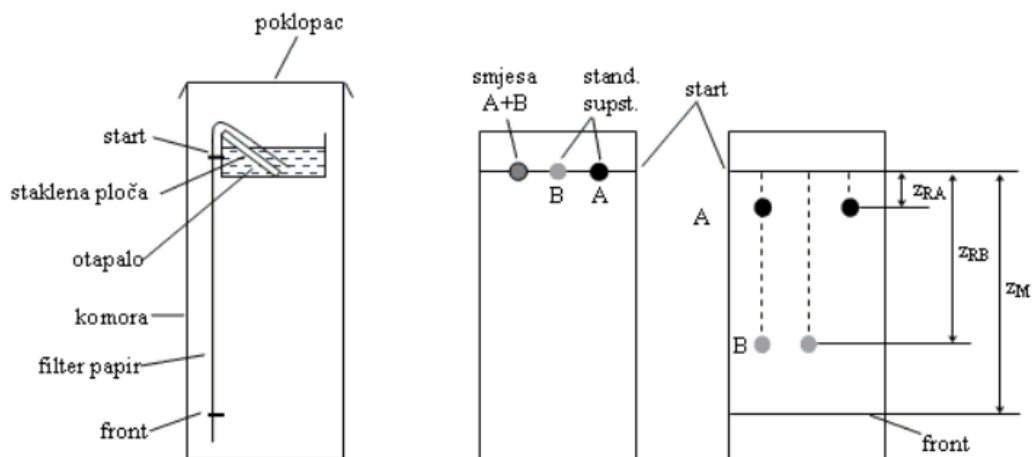
Eluat je najčešće odijeljen na dva jednaka dijela tako da analit dospije u oba detektora istovremeno, ali retencijsko vrijeme između ljudskog detektora odnosno nosa i onog umjetnog najčešće varira, zato što klasični detektori djeluju u vakuumu, a ljudski nos pri atmosferskom tlaku. Ova metoda se često upotrebljava u kombinaciji sa masenom spektroskopijom kako bi se svi mirisi i njihove komponente mogli identificirati što točnije [8].

4.2. Kromatografija na papiru

Papirna kromatografija je vrsta kromatografije koja se izvodi na filter papiru koji ujedno predstavlja i stacionarnu fazu, a sastoji u smjesi putuju različitim brzinama u smjeru širenja otapala kroz filter papir koji je svojim rubom uronjen u otapalo odnosno mobilnu fazu. Čestice se razdvajaju na temelju topljivosti između vodene faze vezane za papir i netopljive organske faze. U slučaju kad je papir osušen i impregniran primjerice s parafinskim uljem, vodeno otapalo će činiti mobilnu fazu i tada se to naziva kromatografija obrnute faze. Mobilna faza se može spuštati ili uzdizati, također je bitno da uvjeti u laboratoriju budu zadovoljavajući. Ako je atmosfera previše suha, analit se ne može efikasno raspodijeliti između dvije faze te se upravo iz tog razloga papir najprije mora zasititi parama vodenog otapala. Retencijski faktor (R_f) je vrijednost koja predstavlja omjer udaljenosti od početka do središta točke supstance koja se izdvaja i udaljenosti od početka do fronte otapala. U idealnim slučajevima R_f vrijednost bi trebala iznositi od 0,15 do 0,85 [9]. S obzirom na smjer širenja mobilne faze razlikuju se silazna, uzlazna i horizontalna kromatografija. U pravilu se češće upotrebljava silazna kromatografija (Slika 1) jer kod nje mobilna faza putuje prema dolje uslijed sile teže i ona kraće traje u odnosu na uzlaznu. U tom slučaju se startna linija nalazi na vrhu filter papira te se on gornjim rubom uroni u otapalo koje se nalazi u komori također na vrhu. Dijelovi smjese putuju različitim brzinama kako se otapalo spušta prema dolje i ostaju vidljivi na drugim udaljenostima na filter papiru. Silazna kromatografija se najčešće upotrebljava za razdvajanje šećera i boja [9].

Uzlazna kromatografija (Slika 2) je specifična po tome što se nakon nanošenja točke za slijepu probu na startnoj liniji filter papir uroni u sloj otapala u komori za kromatografiju koja je zasićena vodenim parama te se ona zatvori. Kod uzlazne kromatografije mobilna faza se zbog posljedica kapilarnosti podigne do razine fronta otapala što ujedno označuje i kraj kromatografije, a sa sobom otapalo dok se penje ostavlja tragove sastavnih dijelova smjese na filter papiru. Kromatografija se primjenjuje u analizi hrane za identifikaciju i odjeljivanje

sastojaka smjese. Papirna kromatografija se najčešće upotrebljava za odjeljivanje hormona, lipida, šećera, aminokiselina, vitamina i enzima. Nedostaci papirne kromatografije su što točke najčešće nisu dobro i jasno vidljive, metoda je dosta sporija u odnosu na tankoslojnu kromatografiju (eng. *thin layer chromatography*, TLC), uvjeti za razvijanje kromatograma mogu biti nepovoljni te je sama metoda manje precizna s obzirom na TLC [10].

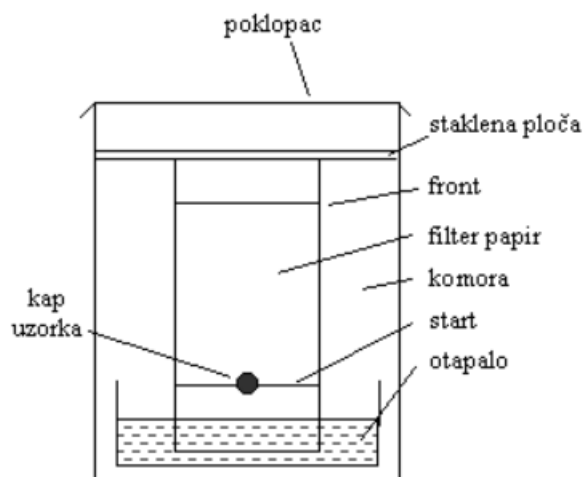


Slika 1. Silazna kromatografija [10].

Z_{RA} i Z_{RB} predstavljaju vrijednosti udaljenosti od starta do točke A i B, a Z_M udaljenost od starta do fronta otapala. Iz omjera Z_{RA} odnosno Z_{RB} i Z_M može se izračunati R_f prema jednadžbama 1 i 2:

$$R_{fA} = \frac{Z_{RA}}{Z_M} \quad (1)$$

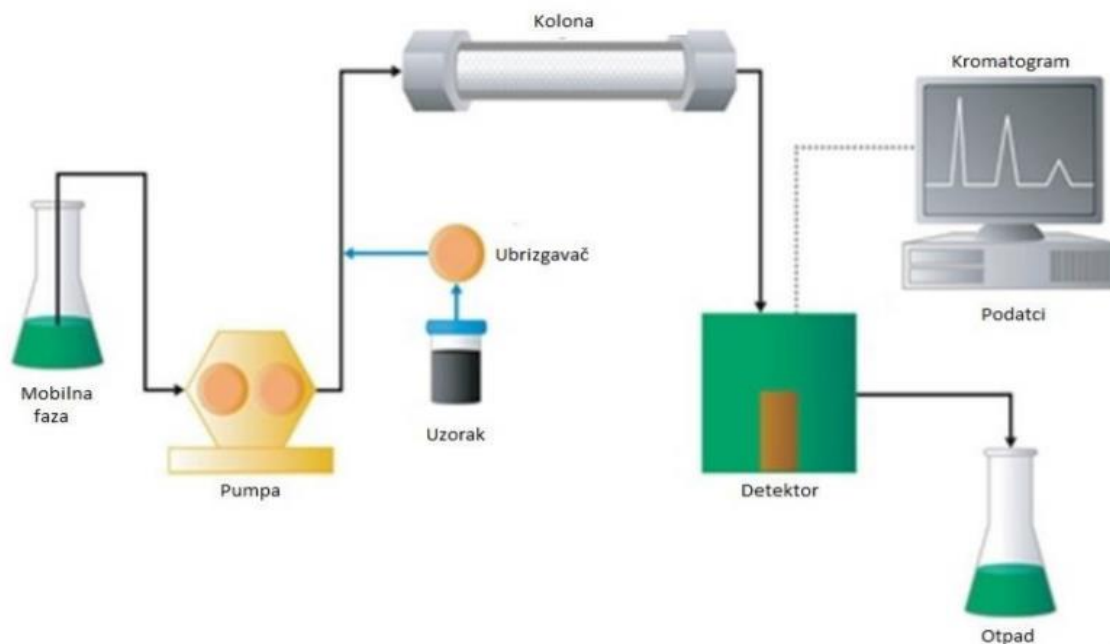
$$R_{fB} = \frac{Z_{RB}}{Z_M} \quad (2).$$



Slika 2. Uzlazna kromatografija [10].

4.3. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*, LC) je metoda razdvajanja komponenata koja se provodi na koloni ili ravnini te joj je mobilna faza tekućina. LC koja u svojoj metodi upotrebljava visoki tlak te sitne, porozne čestice pakirane u kolone koje čine stacionarnu fazu naziva se još i kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Kod tekućinske kromatografije razlikuju se ona normalne faze (eng. *normal phase liquid chromatography*, NPLC) u kojoj je mobilna faza manje polarna u odnosu na stacionarnu te ona reverzne faze (eng. *reversed phase liquid chromatography*, RPLC) gdje je mobilna faza polarnija u odnosu na stacionarnu [6]. HPLC (Slika 3) je jedna od najučinkovitijih metoda razdvajanja smjese, ali ujedno je i spora metoda, te se ona upotrebljava kada je nemoguće lako razdvojiti smjesu pomoću neke druge metode. Primjerice upotrebljava se kada treba izdvojiti velike molekule ili ione i čestice koje se lako raspadaju pri visokim temperaturama. Suvremeni uređaji za HPLC su olakšali kromatografiju i ubrzali samo proces. Uređaj se sastoji od pumpe, ubrizgivača, same kolone u kojoj se odvija kromatografija i detektora. Dva detektora koja su se pokazala najefikasnijima pri ispitivanju kvalitete hrane su ultraljubičasti apsorpcijski detektor (eng. *ultra-violet*, UV) i diferencijalni refraktometar [9].



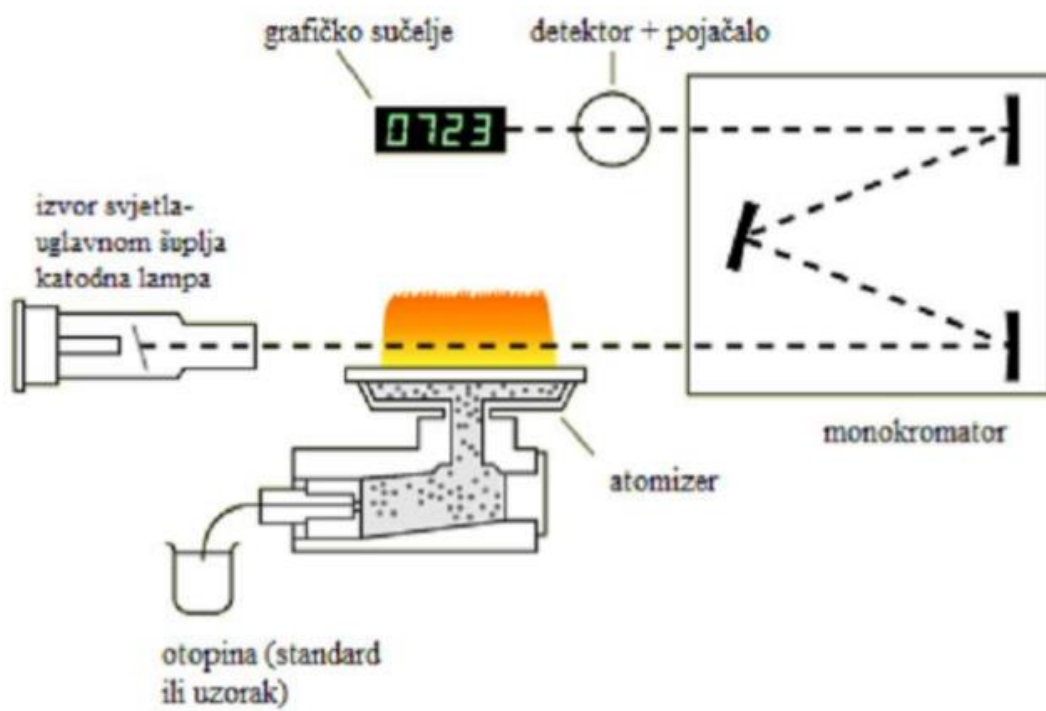
Slika 3. Dijelovi HPLC uređaja [11].

4.4. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda kemijske analize pomoću koje se može odrediti koncentracija otopljene tvari u otapalu tj. u uzorku iz izmjerene količine apsorbirane svjetlosti poznate valne duljine i intenziteta upadnog snopa svjetlosti. Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja i pomoću njega se mjeri apsorbancija uzorka koji je ispitivan. Apsorbancija je funkcija valne duljine svjetlosti stoga je ona ključna za određivanje koncentracije. Svaki spektrofotometar sadrži izvor zračenja koji daje bijelu svjetlost, za područje vidljivog dijela spektra upotrebljava se halogena žarulja, a deuterijeva u slučaju kada se promatraju valne duljine u ultraljubičastom dijelu spektra. Monokromator se u spektrofotometru nalazi u obliku prizme ili optičke rešetke i njegova je uloga razdvojiti svjetlost izvora prema valnim duljinama čiji raspon ovisi o širini izlazne pukotine, dok moć samog monokromatora ovisi o širini pukotine između izvora i prizme odnosno optičke rešetke. U prostor za uzorke stavljaju se kivete čija udaljenost između paralelnih stijenki određuje duljinu puta svjetlosti koja prođe kroz uzorak, a snaga upadne svjetlosti se mjeri prije i poslije prolaska svjetlosti kroz uzorak, pa se tako u slučaju otopina kao referentni uzorak najčešće upotrebljava voda, aceton i druga otapala pod uvjetom da se nalaze u kiveti od istog materijala koji je i jednake debljine kao i onaj u kojem se nalazi uzorak. Razlikuju

se dvosnopni i jednosnopni spektrofotometri. Jednosnopni spektrofotometar ima samo jedan snop svjetlosti i on može istovremeno mjeriti samo uzorak pa se referentni uzorak mjeri naknadno, također zasebno. Kod dvosnopnog spektrofotometra zraka monokromatske svjetlosti će se razdvojiti na dva snopa od kojih će jedan snop proći kroz referentni uzorak koji je najčešće voda ili zrak. Drugi snop prolazi kroz uzorak, a snage snopova se istovremeno ili ponekad naizmjenično mjere te zatim i uspoređuju [12]. Detektor zračenja se sastoji od fotoćelije koja predstavlja senzor te ona daje električni signal koji je proporcionalan intenzitetu upadne svjetlosti te se on preračunava u apsorbanciju. Krajnji dio spektrofotometra predstavlja procesor koji očitava signal s detektora. Spektrofotometrija se najčešće upotrebljava u analizi ulja i otopina šećera [8].

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) se temelji na činjenici da se atom, molekula ili ion može dovesti u pobuđeno stanje ako se dovede dovoljna količina energije te on prelazi na viši energetska nivo. Također je poznato da kad atom prelazi iz višeg energetska stanja ili nivoa u niže, on emitira energiju što se očituje u obliku spektra koji je karakterističan za svaku tvar. Također prilikom prelaska iz nižeg stanja u više energetska stanje dolazi do apsorpcije i nastaje apsorpcijski spektar. Svaki atomski apsorpcijski spektrofotometar sastoji se od izvora zračenja, plamenika, monokromatora i detektora (Slika 4). U AAS se kao izvori zračenja upotrebljavaju posebne lampe sa šupljom katodom ili električnim pražnjenjem pri visokom tlaku. AAS metoda je vrlo pogodna iz razloga što je vrlo specifična i ima nisku granicu detekcije elemenata u uzorku, također je iz istog uzorka moguće odrediti veći broj elemenata, koncentracijsko područje koje se može primijeniti je vrlo široko, a samo vrijeme analize je vrlo kratko [13].



Slika 4. Dijelovi atomskog apsorpcijskog spektrofotomera [14].

5. PRIPREMANJE I OBRADA UZORAKA ZA ANALIZU

Kvalitetno uzorkovanje je jako važno u procesu analize hrane jer ako ono u početku nije dobro ni sama analiza neće biti uspješna. Pri uzorkovanju hrane treba voditi računa o tome da uzorak dobro prikazuje stvarnu sliku smjese, što u slučajevima homogenih smjesa nije problem jer su one u svim svojim dijelovima jednake, međutim kod heterogenih smjesa treba voditi računa o tome da je u uzorku sadržan svaki dio smjese potreban za analizu odnosno uzorak mora biti reprezentativan. Uzorci koji su dobiveni za analizu se najčešće uspoređuju s nekakvim standardom kako bi se moglo odrediti koji uzorak je najpogodniji za analizu. Također se radi i poduzorkovanje kako bi se dobila što realnija slika i napravila što bolja analiza materijala odnosno u ovom slučaju hrane koja se analizira. Priprema uzoraka se najčešće sastoji od usitnjavanja, drobljenja, gnječenja i slično. Uzorak se mora mehanički obraditi kao bi se dobio analit potreban za analizu. Treba pri tome voditi računa da dolazi do zagrijavanja smjese ako se sjeckanje ili gnječenje odvija u posebnim uređajima što može promijeniti samu kompoziciju uzorka pa je nekad samo usitnjavanje najbolje odraditi ručno. Ponekad uzorke treba i zamrznuti prije analize kako bi se spriječile moguće promjene u strukturi i kompoziciji, stoga je na analitičaru koju će metodu analize odabrati. Za termičku obradu uzoraka često se upotrebljavaju gravimetrijske peći, vakuum peći, parne i vodene kupelji, grijače ploče, plamenici i slično. Pri uporabi ovakvih uređaja za analizu potrebno je regulirati temperaturu da ne dođe do pregrijavanja. Jedna od metoda pripreme uzoraka je i ekstrakcija, odnosno metoda odjeljivanja tvari na temelju različite topljivosti u različitim otapalima. Razlikuju se ekstrakcija tekuće-tekuće i kruto-tekuće. Ova metoda je vrlo brza i efikasna stoga se često upotrebljava za odjeljivanje i koncentriranje tvari te se ona može izvoditi više puta s manjim količinama otapala. Ekstrakcija kruto-tekuće je sporija u odnosu na onu gdje su obje faze tekuće i upotrebljava se kada se masti trebaju izdvojiti iz mesa. Metoda koja se upotrebljava za pročišćavanje je destilacija, a najčešće se upotrebljava obična, frakcijska destilacija ili ona pomoću pare. Frakcijska destilacija se provodi kako bi se odvojile komponente smjese koje imaju slične točke vrelišta [9].

6. ODREĐIVANJE VODE

Udio vode u hrani je različit i kreće se u širokim granicama, voće i povrće sadrži oko 65-95% vode, riba i meso 50-79%, žitarice 10-15%, orašasti plodovi 5-10%, svinjska mast do 0.3% vode. Čak i namirnice s kristalnom strukturom poput šećera i soli sadrže vodu. Tokom skladištenja i same prerade namirnica dolazi do promjena sadržaja vode, ovisno o tome kako se hrana obrađuje. Primjerice prilikom sušenja voća udio vode se smanji na 10-15%. U kandiranom voću je udio vode 12-21%. Njezin udio se također može i povećati ukoliko se hrana zamrzava, pa se tako udio vode u mahunama može povećati za 4-11%. Određivanje udjela vode u hrani je vrlo važno zbog određivanja njezine kvalitete jer je poznato da se većina mikroorganizama razvija u prisutnosti vode. Stoga, kako bi se spriječila kvarljivost hrane, propisani su dozvoljeni udjeli vode u hrani. S većim udjelom vode u hrani raste i enzimska aktivnost te može doći do promjene organoleptičkih svojstava ali i njezine sigurnosti za konzumaciju. Iako postoje mnoge metode analize vode u hrani, točno određivanje udjela vode u hrani je izrazito težak postupak iz razloga što postoje razni načini vezanja vode te dolazi do isparavanja i promjene svojstava što može rezultirati netočnim rezultatima i krivom procjenom, stoga treba imati na umu kemijski sastav hrane koja se ispituje. Voda se u hrani pojavljuje u obliku vezne ili slobodne vode, a razlika je u tome što se slobodna voda lako oslobađa te ju je lakše odrediti prilikom analize, dok vezna bude ujedinjena s hranom te može biti adsorbirana na površini koloidnih čestica, dio kristalne strukture ili čvrsto vezana za proteine i šećere. Metode određivanja vode mogu se podijeliti u tri glavne skupine tj. na metode za izdvajanje vode od suhe tvari, metode za izdvajanje vode na temelju njezine reaktivnosti te metode koje se zasnivaju na fizikalnim svojstvima hrane i udjelu vode u njima.

6.1. Sušenje

Metoda se zasniva na sušenju uzoraka do dobivanja konstantne mase odnosno dok se ona više ne smanjuje te se odvija pod stalnim ili smanjenim tlakom. Izračunavanje udjela vode se vrši oduzimanjem krajnje mase nakon sušenja od one početne prije sušenja. Ako se sušenje odvija u sušioniku pri atmosferskom tlaku do konstantne mase, udio vode može se odrediti prema jednadžbi 3:

$$w(\text{vode}) = \frac{m(\text{vode})}{m(\text{uzorka})} \cdot 100 \% \quad (3)$$

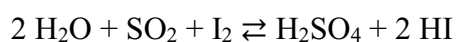
gdje je w (vode) maseni udio vode, m (vode) razlika u masi posude s uzorkom prije i nakon sušenja, dok je m (uzorka) odvagana količina uzorka. Ukoliko se sušenje odvija u vakuum sušioniku postupak je jednak kao i u normalnom sušioniku osim što se izvodi pri nižoj temperaturi od 50-70°C te je metoda pogodna za termički nestabilne spojeve kao što je D-fruktoza, one spojeve koji se teško suše kao što su džemovi, marmelade, med i slično, ali i za hranu koja sadrži veliki udio proteina u sebi s obzirom da proteini podliježu denaturaciji prilikom izlaganja visokim temperaturama. Sušenje se može izvoditi i uz dodatak etanola i kvarcnog pijeska jer se na taj način povećava površina uzorka i voda brže isparava što se upotrebljava za hranu koja teško gubi vodu, sadrži visoki udio proteina ili je u polutekućem obliku. Također jedna od metoda je sušenje u eksikatoru na sobnoj temperaturi iznad sumporne kiseline i uglavnom se upotrebljava za termički stabilne supstance kako bi se odredio udio vode u biljnom materijalu, stočnoj hrani i žitaricama. Temperatura sušenja i priprema probe ovise o svojstvima hrane.

6.2. Destilacija

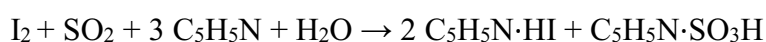
Azeotropna destilacija je posebna metoda određivanja udjela vode koja je pogodna za termički labilnu hranu i sastojke koji su lako isparljivi kao što su primjerice sirupi, čokolade, masti i ulja te začini. U procesu destilacije dodaju se komponente koje se ne miješaju s vodom tj. najčešće organska otapala te dolazi do kondenzacije vodene pare, a mjeri se dobiveni volumen predestilirane vode.

6.3. Ostale metode određivanja vode

Udio vode u hrani može se još odrediti i pomoću poznate količine utrošenog reagensa ili na osnovu nastalog produkta. Metoda s Karl-Fischerovim reagensom se upotrebljava kako bi se saznala ukupna količina slobodne i vezane vode i bazira se na povratnoj reakciji jodometrijske titracije sumporovog dioksida u prisutnosti vode.



Karl-Fischerov reagens sadrži i piridin koji omogućava da se reakcija odvija s lijeva u desno, dok metanol iz reagensa razara sumporov dioksid i jod.



Radi se titracija probe s Karl-Fischerovim reagensom do pojave slobodnog joda uz promjenu boje od žute do tamno žute, a jod služi kao indikator. Titracija se također može izvoditi i potenciometrijski. Metoda s acetilkloridom je pogodna za određivanje vode u organskim spojevima kao što su masne kiseline ili općenito masti, ulja, margarin i slično. Zasniva se na reakciji acetilklorida uz prisutni katalizator piridin koji će s vodom izreagirati i dati octenu kiselinu koju se može odrediti titracijom. Također se može primijeniti metoda s kalcijevim karbidom kod primjerice određivanja udjela vode u brašnu, ali ona nije primjenjiva kod hrane u kojoj su koloidne čestice vezale vodu na sebe. Voda će reagirati s kalcijevim karbidom i nastati će acetilen koji se određuje volumetrijski ili gravimetrijski. Osim ovih metoda udio vode se također može odrediti i raznim elektrokemijskim ili refraktometrijskim metodama [15].

7. DOKAZIVANJE TEŠKIH METALA

Najčešće metode dokazivanja teških metala su one taložne gdje se metali talože u obliku sulfata. Neki od najčešćih reagensa su klorovodična kiselina, amonijev hidroksid i sumporovodik. Prvo se mora dobiti pepeo na način da se željeni uzorak spali i pepeo se rastopi u vodi, dodaje se klorovodična kiselina i smjesa se zagrijava na temperaturi oko 50°C. Nakon zagrijavanja smjesa miruje te joj se dodaje sumporovodik. Ukoliko talog ne nastane znači da teški metali poput arsena, srebra, antimona, bakra, žive, bizmuta, kositra i kadmija nisu prisutni niti u tragovima, a ukoliko se otopina u koju je dodan sumporovodik u svrhu taloženja profiltrira i doda joj se amonijev hidroksid te nastane talog to znači da je u hrani prisutan aluminij, krom, cink, mangan, željezo, nikal ili kobalt [12].

Bakar se može u velikim koncentracijama pronaći u namirnicama koje su bile u doticaju s bakrenim posuđem, stoga je često prisutan u prerađevinama od rajčice ili se dodaje hrani u svrhu pojačavanja zelene boje klorofila. Zbog oksidacije često dolazi do stvaranja bakrova (II) karbonata koji je topiv u organskim kiselinama. Najčešća metoda kojom se dokazuje bakar je metoda s 1%-tnim natrijevim dietil-ditiokarbamatom koji u blago kiseljoj sredini sa solima bakra daje smeđi talog bakrova (II) karbamata koji se otapa u organskim otapalima i pri tome daje žuto-smeđe obojenje. S obzirom da je reakcija vrlo osjetljiva češće se upotrebljava za spektrofotometrijsko određivanje. Neki drugi teški metali mogu ometati navedenu reakciju pa ih se prethodno mora ukloniti dodavanjem versenat-citrata odnosno EDTA.

Željezo se dokazuje pomoću kalijevog ili amonijevog rodanida, odnosno reakcijom Fe^{3+} iona s amonijevim rodanidom te se određivanje koncentracije također provodi spektrofotometrijski. Metoda se izvodi na način da se uzorak spali te se njegov pepeo otopi u klorovodičnoj kiselini ($c = 2 \text{ mol/L}$). Otopina se profiltrira pomoću vruće vode koja je također zakiseljena s HCl. Alikvotni dio otopine se uparava i dodaje se dušična kiselina te se postupak uparavanja ponovi. Ohlađenom uzorku se doda 3%-tna otopina vodikovog peroksida, HCl i aluminijev ili kalijev rodanid te se tikvica dopuni vodom do oznake. Dobivenoj otopini se mjeri intenzitet zračenja na određenoj valnoj duljini iz čega se može odrediti koncentracija Fe^{3+} iona prisutnih u otopini. Fe^{2+} ioni se u otopini određuju pomoću reagensa *o*-fenantrolina s kojim tvore narančasto-crveni kompleks topljiv u vodi. Određivanje koncentracije se vrši spektrofotometrijski kao i u slučaju s Fe^{3+} ionima.

Cinkovi ioni u slabo kiseloj sredini se mogu odrediti pomoću reagensa ditizona koji u reakciji s cinkom daje purpurno-crveni kompleks topiv u tetraklormetanu. Ditizon se osim za dokazivanje cinka upotrebljava prilikom dokazivanja olova koje se može u hrani pojaviti uslijed zaprašivanja insekticidima. Olovo s ditizonom daje crveno obojeni kompleks u otopini amonijevog cijanida, a nastali kompleks se otapa u kloroformu i tetraklormetanu [15].

Po pitanju instrumentalnih metoda koje se upotrebljavaju za određivanje koncentracije pojedinih metala u hrani, najčešće upotrebljavana metoda je AAS.

8. ODREĐIVANJE PROTEINA

Proteini se, za razliku od teških metala, ne dokazuju taloženjem jer ih je na taj način vrlo teško dokazati zato što je gotovo nemoguće pronaći taložni reagens za iste. To je iz razloga što se različiti proteini talože pri različitim pH vrijednostima, ali osim samih proteina u talogu se još nalaze razni organski spojevi i soli. Udio proteina se najčešće ne određuje izravno jer je dobar dio njih hidrofilan, već iz udjela dušika. Analizama je utvrđeno da se dušik u prosjeku u proteinima nalazi u udjelu od 16% stoga ako se pomnoži udio dušika s faktorom $\frac{100}{16} = 6,25$ dobije se udio proteina. Međutim taj faktor se bitno razlikuje od vrste do vrste. Udio dušika u biljkama je znatno veći (16-18,5%) stoga će faktor za računanje biti manji od 6,25. Također treba uzeti u obzir da svaka hrana nema istu količinu proteina u svim svojim dijelovima.

Većina organskih spojeva unutar proteina sadrži dušik koji je najčešće dio aminokiselina koje su slobodne te njihovih amida, pirimidinskih i purinskih baza, nukleotida i nukleinskih kiselina, glikozida, vitamina grupe B, fosfolipida itd. Hrana koja sadrži velik udio proteina, ali manji udio dušika se tretira na način da se dobiveni rezultat koji se prethodno pomnožio s određenim faktorom, označava kao udio sirovih proteina, a ako je slučaj obrnut, tj. ako ima puno spojeva s dušikom u hrani, a mali udio proteina onda se rezultat označava kao udio spojeva s dušikom. Najčešće upotrebljavana metoda za određivanje ukupnih proteina u hrani je ona po Kjeldahlu prilikom koje se uzorak spaljuje nakon čega se pepeo otopi u vodi te dolazi do redukcije dušika u amonijak. Uzorak se zagrijava s koncentriranom sumpornom kiselinom i pri tome se organski spojevi oksidiraju u ugljičnu kiselinu dok će dušik koji se oslobađa u obliku amonijaka tvoriti vezu sa sumpornom kiselinom i nastati će kao produkt amonijev sulfat. Iz količine oslobođenog amonijaka može se odrediti ukupnu količinu dušika, a samim time i proteina u hrani, ali važno je napomenuti da se ne određuje dušik koji je dio nitrata i nitrita. Na ovaj način se određuje ukupni dušik koji se naknadno pomnoži s određenim faktorom preko kojeg se izračuna postotak proteina u hrani.



Udjeli čistih proteina se računaju pomoću metoda po Kellneru i Stutzer-Barnsteinu. Metoda po Stutzer-Barnsteinu je specifična po tome da se sve neproteinske strukture koje sadrže dušik odstrane s vodom jer su u njoj topljive. Ostatak proteina se pri tome istaloži zajedno s netopljivim dijelom proteina te se njihov udio odredi po Kjeldahlovoj metodi. Stutzer-Barnstein metoda nije najefikasnija prilikom određivanja proteina u onoj hrani koja sadrži puno škroba jer nastaje talog kojeg je teško filtrirati i isprati te se zato upotrebljava metoda po Kellneru u tim slučajevima. U ovoj metodi se pomoću vruće vode ekstrahiraju proteini koji su topivi u vodi, ali i neproteinske strukture te se sve zatim taloži pomoću bakrovog sulfata, a nakon toga se u filtratu odredi dio dušika koji ne pripada proteinima. Na kraju se izračuna razlika između ukupnog udjela dušika i udjela dušika u neproteinskim strukturama te se kao rezultat dobije udio čistih proteina. Kad su u pitanju aminokiseline koje su sastavni dio proteina, one se najčešće određuju i identificiraju kromatografskim metodama [15].

9. ODREĐIVANJE MASTI

Udio masti u hrani može se kretati od 0,1% do 100%. Namirnice koje su životinjskog podrijetla sadrže veći udio masti u odnosu na voće i povrće. Najviše masti sadrži hrana poput svinjske i gušćje masti, 99,5%, zatim slijedi maslac s 85%, punomasni sir sa 65%, žumanjak jajeta s oko 32% te mlijeko s 3,5% masti u prosjeku. Zanimljivo je primijetiti da orašasti plodovi također sadrže veliki udio masti, orah 58%, a lješnjak čak 62% što nije slučaj kod primjerice voća i povrća koje sadrži od 0,1% do 1% masti te žitarica s 2%. Analitički gledano, masti su one tvari koje se mogu ekstrahirati pomoću bezvodnog etera te one nakon 60 minuta sušenja na 105°C neće ispariti. Iz hrane se lipidi ekstrahiraju pomoću etera, petroletera, kloroforma i sličnih organskih otapala, ali zajedno s njima se također ekstrahiraju i voskovi, vitamini, pigmenti, slobodne masne kiseline, eterična ulja i druge tvari. Takav ekstrakt naziva se sirova mast, upravo iz razloga što je udio zaostalih tvari u ekstraktu toliko malen da se može zanemariti. Ostale zaostale tvari iz uzorka se također kasnije mogu odvojiti ponovnom ekstrakcijom. Određivanje masti je vrlo važno jer se na taj način određuje energetska vrijednost hrane, a ovisno o kemijskom sastavu i svojstvima hrane odabire se odgovarajuće organsko otapalo i metoda pomoću kojih će se odrediti njihov udio.

Prva metoda za određivanje masti naziva se određivanje po Soxhletu i temelji se na ekstrakciji masti s neodređenom količinom organskog otapala, najčešće etera. Ekstrakcija se vrši u Soxhletovom aparatu (Slika 5), nakon nje se izvrši destilacija te se tikvica suši na 105°C sat vremena što je dovoljno za postizanje stalne mase. Iz razlike u masi tikvice s ekstraktom i prazne tikvice se dobije udio masti u ispitivanoj hrani. Uz eter se upotrebljava i petroleter u slučaju kada se trebaju analizirati vlažne namirnice što nije moguće izvesti s eterom.

Druga metoda je metoda po Weibullu i Stoldtju gdje se uzorak prethodno otapa u klorovodičnoj kiselini da bi došlo do hidrolize škroba i proteina u uzorku. Na taj način se može odrediti točan udio lipida koji se Soxhletovom metodom nije mogao utvrditi precizno i metoda se najčešće upotrebljava za analizu masti u mesu, siru i pecivu. Kada bi se ekstrakcija vršila odmah s eterom u slučaju ovakve hrane ne bi se dobili valjani rezultati jer eter ne bi dovoljno brzo prodirao u čestice hrane jer se mast nalazi vezana za proteine ili ugljikohidrate. Smjesa s uzorkom i klorovodičnom kiselinom se zagrijava a nakon toga još dodatno razrjeđuje vodom te se sve zajedno filtrira. Filtrat s masti se suši 2 do 3 sata na

105°C i nakon toga se prebaci u Soxhletov aparat i nastavi se određivati po prethodno spomenutoj metodi.

Treća najčešća metoda za određivanje udjela masti u hrani je metoda po Grossfeldu u kojoj se za ekstrakciju upotrebljava točno određena, poznata količina organskog otapala, točnije 300 mililitara u tri obroka te se kao otapalo prilikom ekstrakcije upotrebljava trikloretilen. Izračun udjela masti u tom slučaju dobije se na slijedeći način:

$$w(\text{masti}) = \frac{100}{OK} \cdot \frac{100 \cdot a}{25 - \frac{a}{\rho}} \% \quad (4)$$

gdje je $w(\text{masti})$ maseni udio masti, a masa ostatka od 25 mililitara trikloretilenskog ekstrakta izražena u gramima, OK je izmjerena količina uzorka, a ρ gustoća ekstrahirane masti. Vrijednost ρ se razlikuje za svaku hranu, stoga on iznosi 0,91 za masti životinja, kakao mast, repicu i palmino ulje, 0,92 za maslac, margarin, maslinovo, kikiriki i sezamovo ulje te kokosovu mast, a 0,93 iznosi vrijednost za laneno ulje. U nekim slučajevima se ekstrakcija ne može vršiti s trikloretilenom kao otapalom pa se u tom slučaju uzorak zagrijava i otapa u smjesi HCl i H₂SO₄ u omjeru 1:1 dok se ne razgrade svi proteini [15].



Slika 5. Soxhletov uređaj [16].

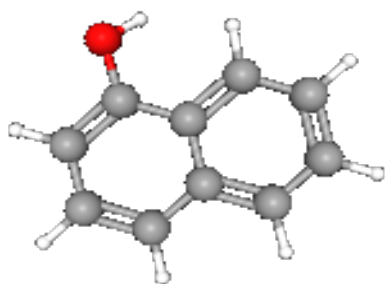
10. ODREĐIVANJE UGLJIKOHIDRATA

Ugljikohidrati se veliki dijelom nalaze u hrani koja je biljnog podrijetla, a nešto manje su zastupljeni u namirnicama životinjskog podrijetla. Mogu se podijeliti na mono-, oligo- i polisaharide. Monosaharidima pripadaju šećeri poput fruktoze i glukoze. Obje su sastavni dio meda i nalaze se u voću, a mogu se dobiti i hidrolizom stolnog šećera saharoze. Dijabetičari upotrebljavaju fruktozu, dok se glukoza dodaje slatkijima u svrhu zaslađivača u obliku sirupa. Monosaharidi poput galaktoze, manoze i ostalih se rijetko određuju jer se nalaze u malim količinama u slobodnom stanju, a češće se nalaze u vezanom obliku zajedno s nekim drugim molekulama. Važniji disaharidi u analitici su saharoza koja se u malim količinama nalazi u voću i povrću, a u većem udjelu u sokovima, sirupima i džemovima (10-70%), laktoza koja se nalazi u mlijeku i mliječnim proizvodima te maltoza koja je dio škroba i nalazi se u brašnu. Najpoznatiji polisaharid je zasigurno škrob koji čini 70-77% žitarica. Njegov sadržaj je 50-55% u mahunama, 20% u krumpiru i 8-19% u voću međutim on se može nalaziti u hrani i u obliku aditiva. Od ostalih polisaharida još se određuje i celuloza.

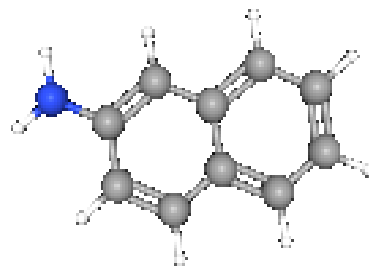
Ugljikohidrati se najčešće analiziraju kako bi se procijenila kvaliteta sastojaka u smislu zakonskih regulativa. Primjerice, bijeli šećer mora sadržavati minimalno 99,6% saharoze određene polarimetrijom, sirup u bombonima mora sadržavati 32-44% reducirajućih šećera, voćni sirup minimalno 60%, kiselo vrhnje primjerice ne smije sadržavati škrob, a ukoliko se proizvodu dodaje mlijeko u prahu ne smije se premašiti 2% i u tom slučaju se u takvim namirnicama određuje sadržaj laktoze. Kada se radi analiza uzorka koji sadrži šećer važno je odstraniti sve ostale komponente koje nisu šećeri te je prije samo analize potrebno jako dobro usitniti uzorak, pogotovo ako je riječ o biljnom materijalu. To je važno kako bi se pokidale sve stanične membrane jer se u njima također nalazi određeni udio šećera koji se mora uzeti u obzir kako bi analiza dala dobre rezultate. Zatim se priprema vodeni ekstrakt na način da se šećeri topljivi u vodi otope na temperaturi od 40-50°C u vodenoj kupelji. Temperatura se ne smije premašiti kako ne bi došlo do hidrolize kiselina i raspadanja koloida. Koloidi poput proteina dovode do zamućenja stoga se moraju ukloniti iz otopine, jer utječu na optičku aktivnost te se u njihovoj prisutnosti ne mogu primijeniti metode koje se zasnivaju na redukciji iona iz alkalnih otopina njihovih soli jer bi došlo do taloženja proteina. Stoga se svi suvišni spojevi odstranjuju dodatkom sredstava za razbistravanje, a aminokiseline i ioni iz otopine se odstranjuju preko ionskih izmjenjivača. S obzirom da ne postoji univerzalni reagens za razbistravanje, najčešće se upotrebljavaju olovov acetat i Carrezov reagens koji se sastoji od dvije otopine. Prva otopina je kalij-željezo(II) cijanid, a

druga je otopina soli cinkovog sulfata i acetata. Također se uz ova dva reagensa upotrebljavaju i volframova kiselina, aluminijev hidroksid i aktivni ugljen.

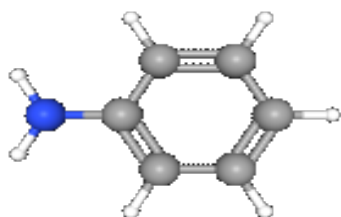
Za identifikaciju monosaharida i oligosaharida upotrebljava se šest tipova reakcija. Prve u nizu su obojane reakcije s fenolima, aromatičnim aminima te drugim specifičnim reagensima i temelje se na dehidraciji šećera pod utjecajem kiselina kao što su sumporna, klorovodična, 3-klor-octena, ftalna i slično te nastanka furfurala iz pentoze ili heksoze. Aromatični amini koji se upotrebljavaju za analizu su najčešće α -naftol (Slika 6), β -naftilamin (Slika 7), anilin (Slika 8) i difenilamin (Slika 9). Ostale obojene reakcije se temelje na primjeni reagensa koji daju obojene produkte s metilfurfuralom i njegovim produktima razgradnje i reagensa koji su se reducirali primjenom reducirajućih šećera, primjer je metilensko modriilo.



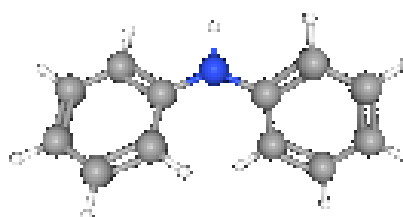
Slika 6. Struktura α -naftola [17].



Slika 7. Struktura β -naftilamina [18].



Slika 8. Struktura anilina [19].



Slika 9. Struktura difenilamina [20].

Druga skupina reakcija su reakcije koje se temelje na redukcijskim svojstvima šećera, primjerice monosaharid maltoza i disaharid laktoza reduciraju ione metala iz alkalnih otopina njihovih soli te kao produkt daju elementarni metal ili njegov oksid. Za saharozu se primjenjuje ista metoda ali nakon hidrolize. Najviše se upotrebljava reakcija alkalne otopine bakrova (II) sulfata s Fehlingovim (smjesa otopina bakrova (II) sulfata i lužnate otopine kalijeva natrijeva tartarata) ili Benedictovim reagensom (otopina natrijeva karbonata i citrata

te bakrova (II) sulfata pentahidrata). U reakciji s jednim od navedenih reagensa prilikom redukcije Cu^{2+} iona nastaje bakrov (I) oksid koji tvori crveni talog. Može se također upotrebljavati i Tollensov reagens (amonijakalna otopina srebrvog nitrata) u ovoj metodi.

Reakcije koje se temelje na optičkoj aktivnosti predstavljaju sljedeću skupinu reakcija, a temelje se na reakciji fenilhidrazina s aldozama ili ketozama te daju specifične produkte ovisno o reaktantu s kojim reagiraju, a za samu identifikaciju se upotrebljava nitrofenil-, bromfenil- ili 2,4-dinitrofenilhidrazin. Ovisno o temperaturi tališta produkta koji nastaje u kombinaciji s nekim od tri navedena reagensa, moguće je zaključiti o kojem se šećeru radi.

Peta skupina reakcija predstavlja reakcije s kvascem gdje se određeni šećer može identificirati na temelju toga reagira li s kvašćevim gljivicama ili ne, primjerice saharoza, maltoza, D-manoza, D-fruktoza i D-glukoza reagiraju s kvascem dok D-galaktoza, pentoza i laktoza ne reagiraju i zovu se nefermentirajući šećeri.

Posljednja skupina metoda za određivanje monosaharida i oligo saharida je skupina kromatografskih metoda, gdje se upotrebljavaju kromatografija na stupcu, tankoslojna i plinska kromatografija za identifikaciju šećera.

Osim ovih skupina koje su prethodno nabrojane, šećeri se mogu određivati i pomoću gravimetrije, spektrofotometrije, raznih biokemijskih metoda i organoleptičkim ispitivanjima [15].

11. ADITIVI

Aditivi su spojevi koji se dodaju hrani iz više razloga, primjerice kako bi im se sačuvala dugotrajnost i spriječilo propadanje, daju stabilnost proizvodima, poboljšavaju organoleptička svojstva te pojedini sadrže određenu hranjivu vrijednost. Već je i ranije spomenuto kako neki aditivi mogu poslužiti kao zamjena za škrob, a prema namjeni se mogu podijeliti u tri skupine koje su prikazane u Tablici 1 [15].

Tablica 1. Skupine aditiva prema namjeni

Uloga aditiva	Vrsta aditiva
Sprječavanje kvarenja	Antioksidansi, konzervansi
Dobivanje željenog organoleptičkog svojstva	Zaslađivači, arome
Dobivanje odgovarajućeg izgleda i konzistencije	Boje, sredstva protiv pjenjenja, sredstva za želiranje, emulgatori

S obzirom da su aditivi ipak strane tvari, moraju posjedovati određena svojstva kako ne bi bili toksični i opasni za ljudsko zdravlje, stoga treba dobro paziti da se dodaju u količinama koje su dozvoljene propisima i regulativama o kvaliteti hrane, da se ne dodaju osim ako to nije zaista nužno i ne smanjuju hranjivu vrijednost te da se mogu identificirati.

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju i usporavaju kvarljivost masti i ulja ili hrane koja ih sadrži. Uz antioksidanse se dodaju još i sinergisti kako bi se pojačao učinak samih antioksidansa te oni nisu štetni po zdravlje i ne utječu na organoleptička svojstva. Najčešće se upotrebljavaju vinska, limunska i askorbinska kiselina te njihove soli. Antioksidansi se najčešće određuju ekstrakcijskim i kromatografskim metodama.

Konzervansi su kemijski spojevi koji sprječavaju nastajanje i razmnožavanje mikroorganizama u hrani te imaju antibakterijska svojstva, ali pri tome ne djeluju na ljude ako su u propisanim količinama. Mogu podijeliti u dvije skupine prema prikazu u Tablici 2 [15].

Tablica 2. Podjela konzervansa

Organski konzervansi		Anorganski konzervansi
Alifatski	Aromatski	Borati, jodidi, klor, peroksidi, sulfiti, fluoridi, hipokloriti, nitriti
Formaldehid, mravlja kiselina, sorbinska kiselina, heksametilentaamin	Benzojeva kiselina i njezini esteri, salicilna kiselina itd.	

Upotreba konzervansa je znatno opala uslijed tehnološkog razvoja te se često primjenjuju druge metode konzerviranja, stoga se mogu upotrijebiti samo onda kada je to propisano zakonom. Sumporasta kiselina, koja se može dokazati djelovanjem jakih kiselina, u namirnicama ima ulogu konzervansa. Kiseline poput fosforne i sumporne u reakciji s uzorkom će razgraditi sumporastu kiselinu na sumporov dioksid i vodu. Sumporov dioksid će djelovati na kalij-jodid-škrobni papir te dati kompleks plave boje. Slobodna sumporasta kiselina se još može odrediti i titracijom s otopinom joda pri čemu će nastati sumporna kiselina i jodovodik, ali i pomoću destilacije i jodometrijskog određivanja.



Osim sumporaste kiseline kao konzervans se, između ostalih, upotrebljava i borna kiselina koja se dokazuje na način da se uzorak spali i pepeo otopi u destiliranoj vodi, a otopina se blago zakiseli. Ako je prisutna borna kiselina, lakmus papir će se obojiti narančasto ili crveno, a zeleno ili plavo ako nije prisutna. Svaki od konzervansa se uglavnom dokazuje dodatkom specifičnih reagensa u otopinu s uzorkom, volumetrijski, pomoću testa sublimacije i sličnim postupcima, neki organski spojevi se mogu izdvojiti iz uzorka pomoću metoda kristalizacije i destilacije.

Kada su u pitanju umjetne boje, najpoznatija je karamela koja se dobije zagrijavanjem saharoze i ostalih šećera. Za nju je specifično što mala koncentracija karamele može obojiti veliku količinu namirnica. Kemijskim procesima dobivena karamela sadrži u sebi spoj pod nazivom 4-metilimidazol koji ima toksično i kancerogeno djelovanje na ljudski organizam [15]. Glavni reagensi za dokazivanje karamele su otopina pektina i 2,4-dinitrofenilhidrazina koji, ukoliko je prisutna karamela, otopinu oboje svjetlo smeđe. Ostale umjetne boje se dokazuju pomoću posebne metode kromatografije na vuni koja se još naziva i metoda po

Thaleru i Sommeru [15]. Metoda Thaler-Sommer se temelji na reakciji umjetnih boja koje u kiseloj sredini oboje vunu na kojoj se vrši kromatografija. Dolazi do vezanja $-SO_3H$ skupine na amino skupine iz vlakna vune. Boje se ekstrahiraju sa vune i otopina se prenese na papir te se uspoređuju sa standardnim bojama i na taj način identificiraju. Također se može izvoditi i kromatografija na papiru.

Kada se govori o zaslađivačima, sorbitol predstavlja jedan od najčešćih zaslađivača u pekarskim proizvodima. Dokazuje ga se kromatografijom na koloni ili biokemijskim metodama u prisutstvu enzima sorbitol-dehidrogenaze koji katalizira reakciju. Analitička metoda pomoću sorbitol-dehidrogenaze vrši se na način da se pripreme otopine pufera različitih koncentracija i nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) te im se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 340 nm. Iz razlike apsorbancija može se odrediti točna koncentracija NAD^+ koji pod utjecajem enzima oksidira sorbitol u fruktozu uz nastajanje reduciranog oblika $NADH + H^+$ koji je ekvivalentan koncentraciji sorbitola u uzorku [15].

Kofein se upotrebljava kao stimulans i često se nalazi u energetske pićima, dokazuje se ekstrakcijom iz uzorka pomoću kloroforma, a zatim se odredi spektrofotometrijski.

12. ZAKLJUČAK

Hrana koja se konzumira svakodnevno veliki je dio ljudskog života te je upravo zato potrebno ispitati njezinu sigurnost i kvalitetu kako bi se potvrdilo da nije štetna za ljudsko zdravlje. Ukoliko je hrana nesigurna i njezina kvaliteta je ispod kvalitete propisane zakonom, u organizam se može unijeti hranu koja je primjerice bila pod utjecajem mikroorganizama kao što su *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* ili *Escherichia coli* 0157. Svaki od ovih mikroorganizama može prouzročiti veliku štetu u ljudskom organizmu i na taj način ugroziti zdravlje i izazvati simptome poput grčeva, probavnih tegoba, anemije, bolesti bubrega, neuroloških smetnji ili čak i smrti. Osim mikroorganizama opasnost mogu predstavljati i strani predmeti u hrani kao što su drvo ili metali te ljudski produkti. Kako bi se izbjegli bilo kakvi negativni učinci hrane na ljudski organizam, rade se ispitivanja i analize te postoji niz propisanih zakona prema kojima je postavljen standard koji se mora poštivati. Ti zakoni određuju kakva moraju biti fizikalna, kemijska i organoleptička svojstva hrane. Neke metode analize mogu se provoditi instrumentalno dok neke metode provode prehrambeni tehničari koji ispituju organoleptička svojstva kao što su miris, okus, boja, viskoznost, plastičnost, hrskavost i slično. Ispitivanje organoleptičkih svojstava je osim za samu analizu hrane potrebno kako bi se poboljšala kvaliteta hrane i kako bi proizvođači mogli čuti potrebe tržišta i pružiti potrošačima ono što uistinu žele i trebaju. Od kemijskih metoda analize najčešće su plinska kromatografija u kombinaciji s olfaktometrijom, tekućinska, tankoslojna i papirna kromatografija kod kojih se analiza temelji na različitoj raspodjeli komponenata između dvije faze, mobilne i stacionarne. Spektrofotometrija je još jedna u nizu metoda koje se upotrebljavaju za analizu kako bi se mogla odrediti koncentracija neke tvari u otopini iz količine apsorbirane svjetlosti poznate valne duljine i intenziteta upadnog snopa svjetlosti. Kada se govori o određivanju udjela tvari unutar hrane prvo se misli na vodu koja je sastavni dio hrane, stoga je nju važno analizirati jer i ona podliježe raznim promjenama. Najčešće metode analize vode podrazumijevaju sušenje uzorka i destilaciju. Poznato je da voda u Slavoniji obiluje teškim metalima tako da je i njih potrebno analizirati kako ih ne bi bilo u prevelikom udjelu bilo da su došli iz vode ili preko različitih vanjskih utjecaja.

Osim teških metala u hrani je važno ispitati i analizirati, masti, proteine te ugljikohidrate koji su najčešći pokazatelj je li hrana kvalitetna. Kako neke sirovine nisu uvijek dostupne, razvijeni su se aditivi koji često poboljšavaju organoleptička svojstva hrane ili zamjenjuju određene komponente. Oni, osim što se upotrebljavaju u svrhu poboljšanja svojstava, služe i kao svojevrsna zaštita od mikroorganizama i sprječavaju kvarljivost. Aditivi djeluju antibakterijski na mikroorganizme, stoga se postavlja pitanje hoće li aditivi u tom slučaju djelovati antibakterijski i na korisne bakterijske kolonije u čovjekovom organizmu? Kako bi se taj neželjeni učinak spriječio, propisane su sigurnosne doze aditiva koje nisu štetne za ljudsko zdravlje. Iz svih ovih informacija da se zaključiti kako je analiza hrane važna u svrhu poboljšanja kvalitete, sigurnosti, ali i kako bi se ispitivala njezina svojstva. Što se više istražuje i analizira, prije se dolazi do kolektivnog napretka te se odbacuju štetne tvari iz hrane. Istraživanjem se stvaraju nove spoznaje koje dovode do napretka u preradi i proizvodnji hrane, a samim time se osigurava bolja i sigurnija hrana za budućnost.

13. LITERATURA

- [1] <https://www.hapih.hr/опасne-bakterije-podrijetlom-iz-hrane-i-kako-ih-izbjeci/> (5.6.2021.)
- [2] Z. E. Sikorski, Chemical and Functional Properties of Food Components, 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [3] https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_05_46_1554.html (5.6.2021.)
- [4] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=52475> (7.6.2021.)
- [5] V. Yadav, Food Analysis and Quality Control, Government Polytechnic, Mandi Adampur, 2011.
- [6] M. Matanović, Primjena separacijskih metoda u analitičkoj kemiji, Završni rad, Odjel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2020.
- [7] H. Rajput, J. Rehal, Methods for Food Analysis and Quality Control, Apple academic press Inc, Burlington, 2019.
- [8] M. Brattoli, E. Cisternino, P. R. Dambruoso, G. de Gennaro, P. Giungato, A. Mazzone, J. Palmisani, M. Tutino, Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds, Sensors 13 (2013) 16579-16800.
- [9] Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Manuals of food quality control, Food Analysis, general techniques, additives, contaminants, and compositions, 7th edition, Rome, 1986.
- [10] http://free-zg.htnet.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09133.htm (28.6.2021.)
- [11] Dž. Dražen, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Završni rad, Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2019.
- [12] N. Kallay, S. Žalac, D. Kovačević, T. Preočanin, A. Čop, Osnovni praktikum fizikalne kemije, Fizikalno kemijski praktikum I, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
- [13] J. Đorđević, O. Maćej, Atomska apsorpciona spektrofotometrija i njena primena u određivanju mineralnog sastava mleka, Mljekarstvo 32 (1982) 233-243.
- [14] I. Milas, Primjena atomske apsorpcijske spektrometrije u analitici lijekova, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
- [15] J. Trajković, J. Baras, M. Mirić, S. Šiler, Analize životnih namirnica, Tehnološko-metalurški fakultet univerziteta u Beogradu, Beograd, 1983.
- [16] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=Soxhletov+ekstraktor> (10.7.2021.)
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Naphthol#section=2D-Structure> (7.9.2021.)

[18] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Naphthylamine#section=2D-Structure>
(7.9.2021.)

[19] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aniline#section=3D-Conformer>
(7.9.2021.)

[20] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diphenylamine#section=3D-Conformer>
(7.9.2021.)