

Утврђивање присуства биолошких и хемијских контаминената у храни

Драган Цветковић, Сања Петровић, Јелена Звездановић,
Саша Савић, Милорад Цакић

Сажетак. *Значај и неопходност контроле квалитета хране се може посматрати са најмање два аспекта – поузданости и сигурности конзумирања одређене намирнице, али и грађења повјерења конзумента према произвођачу. Имајући ово у виду није потребно посебно наглашавати важност непрестаног усавршавања постојећих и развоја нових спектроскопских и хроматографских техника, које се баве контролом квалитета намирница. У намјери да се савремена достигнућа на неки начин сумирају, циљ овог поглавља јесте преглед савремених техничко-технолошких модификација постојећих спектроскопских и хроматографских техника које се користе у контроли квалитета намирница. Из богатог арсенала техника, као најчешће коришћене, издвојене су инфрацрвена, Раманска, флуоресцентна и индуктивно спрегнута плазма – оптичка емисиона спектроскопија, као и гасна и течна хроматографија у комбинацији са масеном спектрометријом.*

Кључне ријечи: *Храна, Биолошки активне материје, Методе анализе, спектроскопске методе, Хроматографске методе*

Цветковић Д, Петровић С, Звездановић Ј, Савић С, Цакић М (2020) Утврђивање присуства биолошких и хемијских контаминената у храни. У: Перспективе развоја прехранбене индустрије (Грујић Р, Јањић В, Тркуља Р, уредници). Академија наука у умјетности Републике Српске, Бања Лука: 585 - 618.

Cvetković D, Petrović S, Zvezdanović J, Savić S, Cakić M (2020) Establishment of the presence of biological and chemical contaminants in food. In: Food industry development prospects (Grujić R, Janjić V, Trkulja R, Eds). The Academy of Sciences and Arts of Republic of Srpska, Banja Luka: 585 - 618.

18.1. Увод

Контаминенти, тј. токсичне материје, у храну доспијевају из природних извора, настају у току процеса производње, обраде или чувања намирница, или пак потичу из материјала и предмета који долазе у додир са храном. Не могу се занемарити и контаминенти који потичу из животне средине и производи су индустријских загађивача и претјеране употребе пестицида. Природни контаминенти могу бити биљног, животињског или микробног поријекла.



Очување квалитета хране и сигурност њеног конзумирања су теме које никад не губе на својој актуелности. Идентификација контаминената у намирницама, како хемијских тако и биолошких (гљиве, бактерије и вируси) је неопходна ради санитарне контроле хране. Методе очувања квалитета хране, било да се ради о хлађењу, сушењу или конзервисању, представљају један вид активности, док је развој савремених техника за брзу и сигурну провјеру квалитета хране сасвим други, али не и мање важан, вид континуираног развоја. Највећи напор се улаже у унапређењу старих и развоју нових техника, које се користе у контроли микробиолошке безбједности хране, али и њене безбједности у смислу присуства/одсуства других контаминената. Озбиљна, усавршена и поуздана контрола квалитета одређене намирнице не води само ка већем конзумирању већ, много важније, ка већем повјерењу код конзументата.

18.2. Спектроскопске технике у анализи хране

Спектроскопске технике које се базирају на употреби видљиве и инфрацрвене свјетлости (VIS/IR), Раманска, NMR и флуоресцентна спектроскопија су најчешће коришћене у контроли намирница, због њихове недеструктивности, једноставности примјене, ефикасности и минималних захтјева у погледу количине и припреме узорака (He and Sun 2015). Поред контроле намирница у погледу исправности и безбједности, у посљедње вријеме се све више намеће још једна изузетно важна употреба спектроскопских техника у прехранбеној индустрији, а огледа се у контроли аутентичности намирница, у смислу њиховог поријекла, али и кривотворења и злоупотреба најразличитије врсте. Различити скандали, који су потресали свијет посљедњих година, као што је скандал са кинеским млијеком из

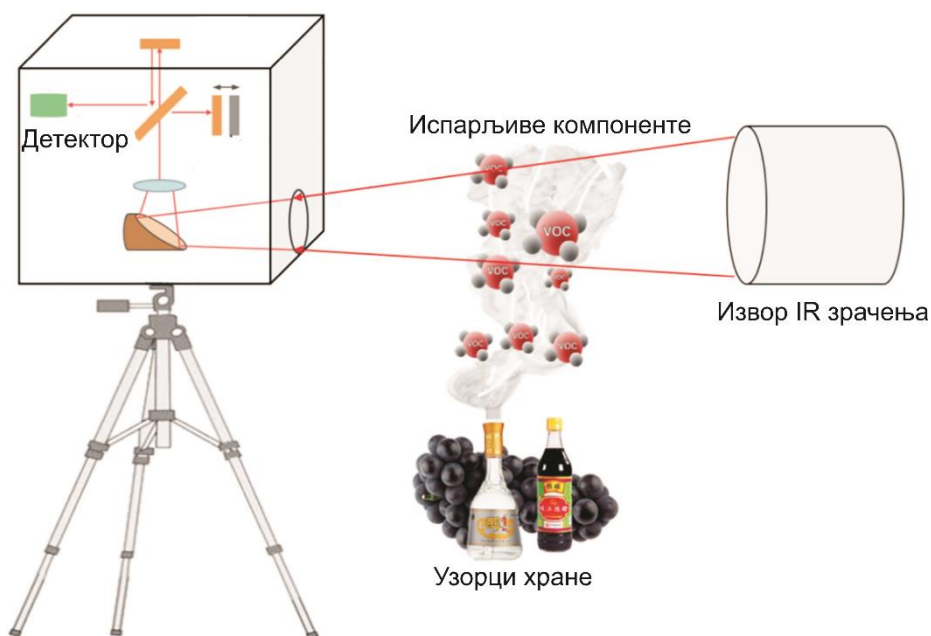
2008. год. и скандал са коњским месом из 2013. год. лансирали су развој спектроскопских техника, које имају задатак да очувају интегритет ланца снабдијевања храном, да открију злоупотребе, али и да превенирају сваки покушај злоупотреба (McGrath et al. 2018; de Santana et al. 2019). Овако велики захтјеви довели су до развоја посебних анализа и техника које подразумевају откривање „отиска прстију“ одређене хране, тј. откривање специфичног једињења које гарантује њено поријекло и идентитет, али и дизајнирање методе за брзо праћење овог једињења у цијелокупном и изузетно сложенем матриксу какав храна и јесте (Cozzolino 2016; Martins et al. 2019; Medina et al. 2019).

18.2.1. Инфрацрвена спектроскопија

Брзе и недеструктивне аналитичке методе за директно мјерење параметара хране, како у чврстом тако и у течном стању, су основни предмет развоја посљедњих деценија. Дифузионе рефлексионе спектроскопске технике се углавном користе за праћење квалитета хране у чврстом стању, док се трансмисионе технике и оне базиране на ослабљеној тоталној рефлексији углавном користе за узорке хране у течном стању (Dong et al. 2019).

У аналитичком смислу IR спектроскопија подразумева апсорпцију зрачења из области ~ 1 до $1000 \mu\text{m}$ или 10^4 до 10 cm^{-1} . Инфрацрвена спектроскопија је, посебно у области блиског инфрацрвеног зрачења (NIR, $0,78\text{-}2,5 \mu\text{m}$), нашла огромну примјену у спектроскопским техникама за праћење квалитета хране (Osborne, 2006; Porep et al. 2015). Најзначајније траке у NIR области код релевантних биомолекула потичу од овертонова и комбинације фундаменталних вибрација од C-H, N-H, O-H и S-H веза. Хемијске карактеристике, микробиолошка исправност, поријекло и идентитет хране могу бити праћене снимањем NIR спектра и уз употребу хеометријских метода или дводимензионалне корелационе спектроскопије, у циљу отклањања недостатака и унапређења основне методе, у смислу повећања резолуције спектра и појачане детекције код квалитативне анализе (Noda 2015; You et al. 2015; He et al. 2015). Поред наведених техника које се користе за снимање узорака хране у чврстом и течном стању, NIR спектроскопија је нашла примјену и у анализи испарљивих компонената које итекако пружају информације о физичко-хемијским карактеристикама и тренутном стању хране (Dong et al. 2019). Насупрот гасној хроматографији куплованој најчешће са масеном спектрометријом, која даје најпрецизније резултате у погледу анализе испарљивих једињења, али уз релативно комплексну припрему узорака, спектроскопске методе омогућавају брзу, тј. тренутну, детекцију испарљивих компонената у гасној фази. Оптичке спектроскопске технике обично имају мању резолуцију, и остљивост у односу на гасно-хроматографске технике, али омогућавају тренутно, *in situ* и јефтино праћење компонената од интереса. Будући да већина испарљивих органских молекула (енг. *volatile organic compounds*, VOCs) има специфичне апсорпционе спектралне карактеристике у NIR области, ова метода је веома често коришћена за квантитативно и квалитативно праћење

састава гасне фазе изнад намирница, а самим тим и њихов квалитет. Анализа гасне фазе изнад намирница и идентификација VOCs једињења подразумева пропуштање инфрацрвеног зрака кроз колектор гаса смјештеног између извора свјетлости и интерферометра, али уз употребу мулти-рефлектујућих огледала, која вишеструко повећавају оптички пут, имајући у виду да је концентрација биомаркера обично изузетно мала. На овај начин је могуће пратити промјене концентрације алкохола и естара током складиштења воћа или амонијака током кварења меса (Dong et al. 2014; Zhang et al. 2015). Поред наведене методе, данас је могуће пратити промјене у IR спектрима и на тзв. „отвореном путу“ свјетлосног зрака, што омогућава праћење промјене концентрације VOCs са већих даљина (Слика 18.1), и до 5 метара, што је изузетно корисно приликом контроле кварења воћа (Jie-jun et al. 2018; Jiao et al. 2019).



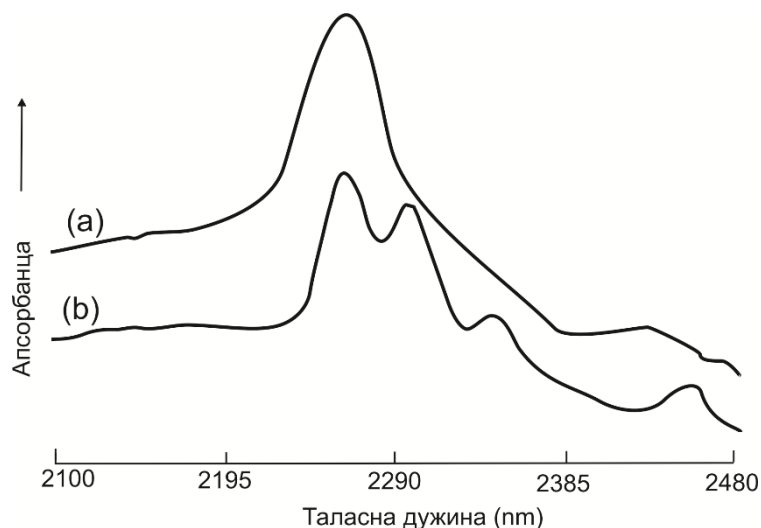
Слика 18.1. Детекција испарљивих једињења из узорака хране помоћу FT-IR спектроскопије на „отвореном путу“ (преузето из Jiao et al. 2019)

Figure 18.1. Detection of volatile compounds from food samples by open path FT-IR spectroscopy (from Jiao et al. 2019)

Промијене у концентрацији VOCs једињења, која прате ферментацију и врење током производње алкохолних пића, се релативно лако детектују услед њихове велике испарљивости, али у функцији од процеса производње, дужине врења, географског подручја, гдје је сировина узгајана. Употребом инфрацрвене спектроскопије, на основу карактеристичних VOCs биомаркера, могуће је разликовати произвођаче, географско подручје, начин производње итд (Dong et al. 2019). Присуство молекула воде и угљен-диоксида приликом контроле сазријевања и кварења воћа је неизбежно. Имајући у виду да наведени молекули

својом апсорпцијом могу маскирати биомаркере у IR спектрима рађено је на њиховом уклањању из гасне смјеше молекуларним ситима, што је дало јако добре резултате (Jiao et al. 2017).

Велики број аутора је у својим радовима документовао примјену NIR спектроскопије у праћењу квалитета хране, од лабораторијских услова све до *in situ* индустријских услова. На основу њихових прегледних радова може се доћи до закључка да су бенефити, која ова техника пружа, немјерљиви са аспекта разноврсности примјене (Porep et al. 2015; He et al. 2015; McGrath et al. 2018). Коришћењем IR (FT-IR, NIR, FT-NIR) спектроскопије могуће је контролисати апсолутно све врсте намирница без великих ограничења у погледу њиховог поријекла или агрегатног стања. Могуће је контролисати алкохолна и безалкохолна пића, млијеко и млијечне производе, воће и поврће, зачинско и остало биље, мед, све врсте меса и месних прерађевина, гљиве, орашасто воће, све врсте уља, житарице, зрна, брашна, тијеста и производе од тијеста, итд. Контролом се, у зависности од врсте намирнице и предтретмана, најчешће прати садржај воде, влаге, алкохола, масти и слободних масних киселина, протеина, слободних киселина, шећера, скроба итд. (Porep et al. 2015). Као илустрација на Слици 18.2 је дат примјер употребе NIR спектроскопије у контроли садржаја метанола и етанола приликом производње алкохолних пића са које се може уочити значајна разлика у изгледу спектра у области 2200-2380 nm, што омогућава лако праћене присуства/одсуства одређене врсте алкохола (метанола).



Слика 18.2. NIR спектри узорака вина који садрже 1% метанола (a) и 1% етанола (b)

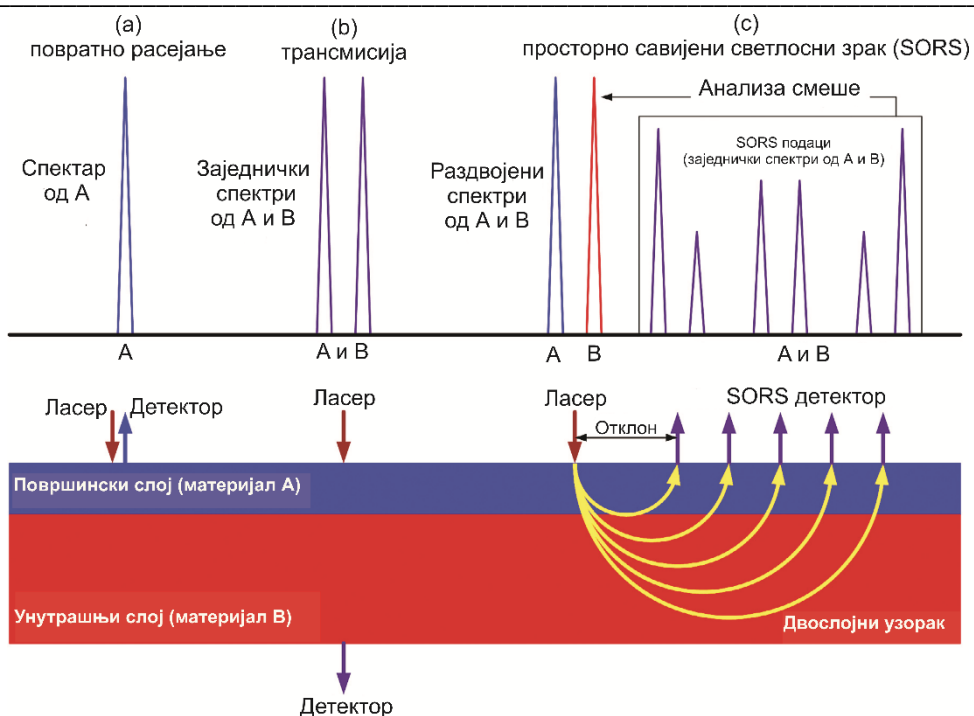
Figure 18.2. NIR spectra of wine samples containing 1% of methanol (a) and 1% of ethanol (b)

FT-IR (NIR) спектроскопија, у комбинацији са адекватним хеометријским техникама, налази примјену и у детекцији контаминаната у храни (Craig et al. 2015). Присуство меламина, који се нелегално додаје неким намирницама (млијеко у

праху, храна за бебе итд) у циљу повећања садржаја азота, се успјешно детектује овим техникама које могу послужити као алтернатива дуготрајним и знатно скупљим хроматографским техникама (Balabin and Smirnov 2011). Поред меламина, могућа је детекција и резидуа антибиотика (тетрациклина) (Sivakesava and Irudayaraj, 2002), стероида и органофосфорних пестицида (Craig et al. 2015).

18.2.2. Раманска спектроскопија

Раманска спектроскопија је неинванзивна техника, базирана на расипању свјетлости на молекулском нивоу. Приликом судара фотона са молекулима узорка долази до три типа расипања свјетлости – Rayleigh-јево, Stokes-ово и анти-Stokes-ово. Ако приликом судара не долази до промјене енергије фотона ради се о Rayleigh-јевом расипању; ако приликом судара долази до размјене енергије фотона и молекула ради се о нееластичном судару и Раманском расипању свјетлости. Уколико фотон предаје енергију молекулу приликом судара ради се о Stokes-овом расипању и, аналогно, ако фотон прима енергију од молекула долази до анти-Stokes-овог расипања. Усљед размјене енергије долази до прелазака између енергетских нивоа унутар молекула, електронских, вибрационих и ротационих. Раманска спектроскопија прати прелазе између вибрационих енергетских нивоа унутар молекула и даје увид у структурне и квалитативне карактеристике узорака (Beganović et al. 2019). Временом се Раманска спектроскопија развила у респективну технику, која је у стању да анализира узорак са високом специфичношћу, захваљујући оштрим и уским пиковима у спектрима и могућности добијања информација са и испод површине узорка, употребом моћних ласера уских области као извора свјетлости (Qin et al. 2017a; b). Употреба ласера је омогућила прецизно подешавање таласне дужине свјетлосног зрака, који је потребан за снимање спектра испитиваног једињења у јако комплексним матриксама без великог ефекта околине. У исто вријеме, употреба ласера омогућава дубоко продирање свјетлости унутар чврстог узорка која, сударајући се са молекулима узорка, сакупља информације о њиховој структури. Принцип је сличан као код инфрацрвене спектроскопије, с тим што се овдје добијају уски и оштри пикови у спектрима који се далеко лакше обрађују математички. У исто вријеме, захваљујући великој енергији ласерског зрака, могуће је покупити информације са много већих дубина унутар узорка хране у поређењу са инфрацрвеном или флуоресцентном спектроскопијом (Qin et al. 2017b). Постоје три главна техничка рјешења која подразумевају употребу ласерског зрака и снимање Раманских спектра у сврху контроле квалитета намирница (Слика 18.3).

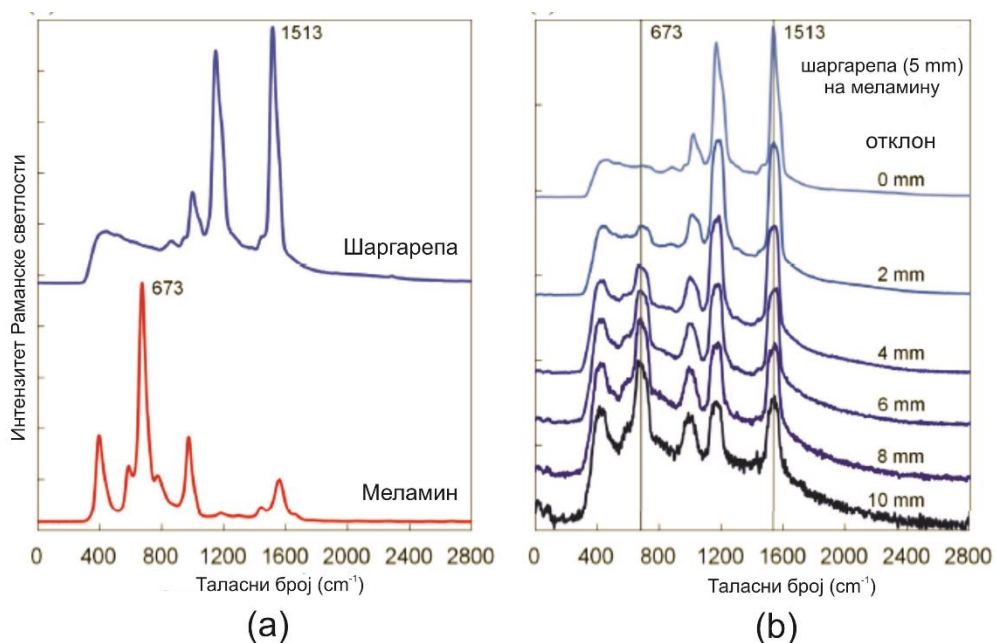


Слика 18.3. Графичка илустрација примјене Раманске спектроскопије у анализи хране снимањем повратног расијања (а), трансмисије (б) и просторно савијеним светлосним зраком (в) (преузето из Qin et al 2017b)

Figure 18.3. Graphical illustration of Raman spectroscopy application in food analysis by measurement of backscattering (a), transmission (b), and spatially offset (c) Raman spectroscopy (from Qin et al 2017b)

Најчешће коришћена је техника „повратног расијања“ (backscattering) услед своје једноставности у конструкцији и манипулисању. Лазер и детектор се код ове технике налазе са исте стране узорка, тако да детектор сакупља повратну расијану свјетлост са мјеста зрачења, сакупљајући на тај начин информације, тј. спектар, само са површине узорка, а не и из његових унутрашњих слојева. Други тип конструкције подразумијева трансмисију свјетлосног сигнала кроз узорак, тако да су извор ласерског зрака и детектор смјештени са различите стране узорка. На тај начин детектор добија информације од свјетлосног зрака који је потпуно прошао кроз узорак. Ова техника је нашла примјену код снимања фармацеутских препарата (таблета и капсула), али и код зрнастих намирница (кукуруз, пиринач) у циљу откривања и потврђивања њиховог географског поријекла. Међутим, трансмисионом техником је немогуће снимити спектре појединих слојева унутар узорка хране, што је практично ријешено техником снимања просторно савијеног свјетлосног зрака (енг. Spatially offset Raman spectroscopy, SORS) (Слика 1.3), који носи информације са различитих дубина унутар узорка. Математичком обрадом и декомпозицијом спектра могуће је диференцирати спектре из различитих слојева узорка на основу њиховог интензитета и осталих карактеристика. Ова техника је најприје развијана као неинванзивна техника посматрања кости *in vivo* и контроле фармацеутских производа унутар паковања, а данас се користи у прехранбеној

индустрији за контролу унутрашње зрелости парадајза, квалитета мяса лосоа кроз кожу итд. (Qin et al. 2017a; b). На Слици 18.4 је дат приказ Раманских спектра меламина у шаргарепи као илустрација потенцијалне контроле намирнице праћењем не само присуства већ и дубине на којој се налази највећа концентрација испитиваног једињења унутар намирнице SORS методом.



Слика 18.4. Референтни спектри меламина и узорка шаргарепе (а) и SORS спектри узорка листа шаргарепе на меламину у праху (б) (преузето из Qin et al. 2017b)

Figure 18.4. Raman scattering spectra of carrot sample and melamine (a) and spatially offset Raman spectra of the carrot-on-melamine sample at selected offset distances (b) (from Qin et al. 2017b)

Поред горе описане методе развијена је и тзв. surface-enhanced Раманска спектроскопија (SERS), у комбинацији са реоксидисаним графен оксид/Au наночестицама и екстракцијом на чврстој фази, као изузетно брза и осјетљива метода за праћење акриламида у прженој храни (Cheng et al. 2019). Ова техника је нашла огромну примјену и у анализи и детекцији природних и вјештачких прехранбених боја, користећи наночестице сребра као појачиваче сигнала уз брзу припрему узорка (Gukowsky et al. 2018). Могуће је квантитативно пратити прехранбене боје у храни у концентрацији до 1 ppm и разликовати већи број њих на основу добијених спектра. Gukowsky и сарадници су дали детаљан преглед спектра и базу података за 16 најчешће коришћених вјештачких и природних прехранбених боја у свом раду (Gukowsky et al. 2018). Раманска спектроскопија, захваљујући својим предностима, налази велику примјену и у анализи присуства наноматеријала у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Наноматеријали могу бити присутни у прехранбеним производима као резидуе из процеса

производње или као наноуређаји који се користе у контроли квалитета хране. Угљенични наноматеријали, укључујући и нанотубе, се користе у виду органских суспензија за третирање сјемена пиринча. Мобилност ових наночестица угљеника, њихова интеграција и преношење на потомство, могуће је пратити Раманском спектроскопијом. Развијене су и SERS методе за праћење присуства пестицида и фунгицида у воћу и поврћу, бактерија и вируса у води, млијеку и другим намирницама, али и за праћење антифунгалне активности наночестица цинка и других метала и њихове ефикасности у заштити хране (Li and Church 2014).

18.2.3. Флуоресцентна спектроскопија

Флуоресценција је емисија свјетлости од стране флуорофора, једињења која имају способност да апсорбују енергију одређене таласне дужине и да је емитују у виду свјетлости на већим таласним дужинама. Флуоресцентна спектроскопија (флуориметрија) има неколико предности у односу на остале спектроскопске технике које се користе у анализи хране, а основна је њена ефикасност и изузетно велика осјетљивост, пошто је 100 до 1000 пута осјетљивија у односу на друге спектроскопске технике. Њен главни недостатак произилази из чињенице да флуоресценција није карактеристика свих молекула и посљедица је њихове структуре (Dankowska 2016). Развојем хеометријских метода и техничким усавршавањем оптичких уређаја, флуоресценција све више налази примјену као брза, осјетљива и недеструктивна техника у контроли намирница преко њихових отисака прстију. Постоји неколико приступа у контроли хране употребом ове технике – преко емисионог спектра, преко ексцитационог спектра, преко тоталне ексцитационо-смисионе луминисценције матрикса (ЕЕМ) и синхронном флуоресцентном спектроскопијом (SFS), која се даље дијели на неколико подгрупа на основу техничког рјешења и положаја монохроматора у уређајима (Dankowska 2016).

Храна садржи велики број флуорофора које могу бити предмет праћења флуоресцентном спектроскопијом и ту спадају алкалоиди, ароматичне аминокиселине, кумарини, флавоноиди, нуклеинске киселине, порфирини, микотоксини, витамини, итд. Флуоресцирајући молекули трпе утицај приликом прераде хране, складиштења и руковања, тако да су згодан индикатор њеног кварења и кривотворења. Користе се за утврђивање географског поријекла хране, класификације сировина, утврђивања степена кварења итд. Аутентичност јестивих уља и масти, млијечних производа, јаја, свих врста меса, рибе, меда, воћа, поврћа, сокова, алкохолних пића и житарица се одређује флуориметријски (He et al. 2015; Dankowska 2016).

18.3. Индуктивно спрегнута плазма – оптичка емисиона спектроскопија (ICP-OES)

18.3.1. Тешки метали

Присуство великог броја токсичних метала првенствено у организму људи и животиња је превасходно посљедица квалитета и безбједности конзумне хране. Анализом људских органа доказано је присуство готово свих метала (Yoo et al. 2002; Goullé et al. 2005). Калцијум, натријум, калијум и магнезијум су метали познатији као макроелементи чије присуство, детектовано најчешће у већим концентрацијама, не остварује токсични ефекат (Petrović et al. 2016, Stojiljković et al. 2018). Поред побројаних макроелемената у организму се налази и значајан број микроелемената попут бакра, мангана, гвожђа, цинка, никла, хрома, кобалта, молибдена и селена. Они се такође убрајају у групу есенцијалних елемената неопходних за нормално функционисање човјековог организма. Посебну групу елемената чине тешки метали: антимон, арсен, олово, жива, никал, калај, бизмут, кадмијум, хром, кобалт, бакар, гвожђе и цинк од којих су хром, кобалт, бакар, гвожђе, никл, калај и цинк потребни организму у малим количинама, док преостали набројани метали представљају опасност по људско здраље. Једном унијети, тешки метали се депонују у јетри, мозгу и бубрезима. Због бројних негативних утицаја неопходно је пратити садржај тешких метала не само у намирницама већ и сировинама, води и земљишту. Загађење настало тешким металима уједно представља и индикатор загађења животне средине.

Због све веће потребе за праћењем садржаја тешких метала, али и осталих есенцијалних елемената неопходних за нормално функционисања организма, истиче се значај аналитичких метода идентификације истих. Посљедњи корак код одређивања неорганских компоненти у узорцима хране је примјена спектрофотометријских метода као што је атомска апсорпција и атомска емисија коришћењем пламена, индуктивно спрегнуте плазме или електронског уређаја за атомизацију. У том смислу, водеће мјесто заузимају ICP-MS (Inductively coupled plasma - mass spectrometry) и ICP-OES (Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry) методе идентификације неорганског садржаја узорака (Olesik 1991; Olesik 1996). Ове инструменталне методе се базирају на специфичном емитованом зрачењу кога емитују побуђени атоми и јони, или апсорбованом зрачењу од стране атома.

18.3.2. ICP-OES спектроскопија

Спектроскопске методе су од свих аналитичких метода најспецифичније и њихова примјена у анализи узорака може да траје само пар минута. Помоћу ових метода више од 70 елемената, укључујући алкалне, земноалкалне, прелазне и тешке метале, се може одредити у различитим врстама узорака са осјетљивошћу од $\mu\text{g/g}$

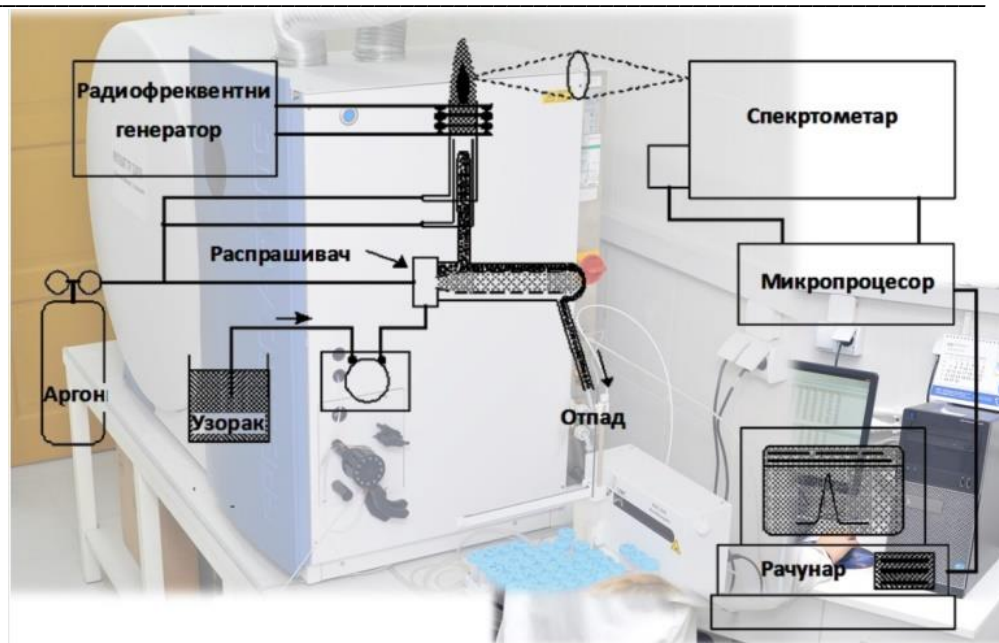
до ng/g. Као извор побуђивања највише се користи индуктивно спрегнута плазма - ICP. Бројне предности ове методе су је издвојиле од осталих аналитичких метода:

- квалитативна и квантитативна анализа елементарног састава узорка обавља се истовремено за већи број елемената у јако кратком року.
- тачност мјерења је већа у поређењу са осталим аналитичким методама.
- јако мала количина раствора довољна је за извођење мултиелементарне анализе, што подразумеива малу количину узорка.

18.3.2.1. ICP-OES инструментација

ICP је безелектродна, најчешће аргонска, плазма која ради на атмосферском притиску гдје се, при високим температурама плазме (6000 - 10000 K), ексцитује извор плазме електричним струјама произведеним електромагнетском индукцијом резултирајући пражњењем релативно велике густине електрона. Шема оптички емисионог спектрометра приказана је на Слици 18.5. Сигнал који уређај формира се састоји из извора плазме и генератора радиофреквентног зрачења. Узорак се у систем уноси посредством распршивача. Процесор сигнала састоји од оптичког система, електронике и јединице за приказивање података, тј. рачунара и одговарајућег софтвера. Извор се састоји од три концентричне кварцне цијеви постављене у индукциони калем са два до три навоја. Кроз централну кварцну цијев у плазму се уводи аеросол узорка струјом аргона који протиче протоком од око 1 l/min. Аеросол долази до плазме кроз централну цијев (*енг. Torch centre tube*) плазменог пламеника (*енг. Torch*) чиме се плазма снабдијева узорком за анализу.

Узорак који је узет за анализу мора бити репрезентативан, тако да његов састав одговара просјечном саставу анализираног система и тај састав не би требало да се мијења током његовог транспорта или складиштења. Најважније од свега је да узорак не смије да се контаминира за вријеме сакупљања, третирања и анализирања. Такође, мора се водити рачуна о чистоћи воде и реагенаса који се користе приликом третмана и анализе, као и о чистоћи саме опреме која се користи у испитивању. Посуде од политетрафлуороетилена или перфлуороалкоксида имају предност за употребу у односу на уобичајене посуде од борсиликатног стакла. Приликом употребе реагенаса, посуђа или друге опреме у току анализе, мора се водити рачуна да се не абсорбују/адсорбују једињења или елементи који се анализирају. Свака анализа узорака хране би требало да се изврши у што краћем временском року, а то посебно важи за узорке који могу да се покваре, иструну или распадне (месо, поврће, воће, риба итд). Анализирани узорци морају бити у течном стању што изискује њихово превођење у течно стање примјеном најчешће метода мокре и суве минерализације (дигестије).



Слика 18.5. Шема ICP- OES спектрометра
Figure 18.5. The scheme of ICP-OES spectrometer

Радиофреквентни генератор снабдијева ICP-а снагом између 600 и 1800 W, што зависи од типа узорка који се анализира, димензија и извора плазме. Оперативна снага за анализу водених раствора се креће од 950 до 1400 W. Фреквенција коју ствара генератор код већине комерцијалних инструмената је 40,68 MHz при чему се постиже добра ефикасност купловања, што има за посљедицу веће температуре и побољшану робусност плазме, као и њену стабилност. Генератори се најчешће хладе путем воде или ваздуха. Оба начина хлађења имају предности и недостатке. Хлађење ваздухом је јефтиније, али са друге стране може бити недовољно ефикасно.

Улога спектрометра је да из спектра који емитује извор плазме издвоји таласну дужину од интереса (аналитичку таласну дужину). Свјетлост која пада на решетку дифрактоваће се у зависности од своје таласне дужине. Свакој таласној дужини одговара одређени угао дифракције, што и доводи до просторног разлагања сложеног зрачења на монохроматске компоненте. Највећи број аналитички корисних линија код ICP-OES-а се налази у области од 130-450 nm, тако да су сви спектрометри који се користе код ICP-OES технике углавном оптимизовани за рад у овом опсегу таласних дужина. Након што је одвајање таласних дужина извршено уз помоћ одговарајућих спектрометара, за читавање добијених спектралних информација користе се детектори.

Узорци који се могу анализирати посредством ICP-OES-а могу бити различитог поријекла – вода, земљиште, биолошки материјал, стијене и свакако храна. Због свега наведеног ICP спектроскопија се може сматрати супериорном у поређењу са осталим аналитичким методама.

18.3.2.2. Идентификација и квантификација тешких метала у храни примјеном ICP-OES методе

Тешки метали се сматрају кумулативним отровима. Тровања тешким металима најчешће настаје након дужег периода изложености и уноса мањих доза путем хране и воде. Олово, арсен, кадмијум и жива су елементи који се у животној средини могу наћи у највећим концентрацијама у односу на остале токсичне елементе. Они се често налазе заједно у загађеној животној средини (Khan et al. 2008; Chen et al. 2000). Контаминација животне средине тешким металима посебно утиче на безбједност хране, јер се тешки метали преко контаминираних земље и воде (Todorović et al. 2018) акумулирају у биљкама и животињама, одакле путем ланца исхране доспију и до људи. На метаболизам и исхрану људи много већи и значајнији утицај имају једињења метала у односу на ефекат метала у елементарном облику. У елементарном стању метали су нерастворни па самим тим и не могу бити употребљени у биолошким системима, тако да и сама жива материја није у стању да их искористи у процесу преношења биолошких сигнала. Живе ћелије су у стању да користе једињења метала као ензими у изузетно софистицираном процесу катализе који је развијан током милиона година еволуције. Количина метала које биљке могу да узму из земљишта не зависи само од њиховог укупног садржаја у земљишту, него и од доступности ових елемената самој биљци (Raskin et al. 1994). Доступност метала биљци је одређена њиховим особинама као што су: хемијски облик метала, растворљивост и способност да комплексирају са органском материјом и да тако буду абсорбовани од стране других конституената земљишта. Исто важи и за остале, више организме. Када доспију у биљку, неки од абсорбованих метала ће остати у коријену, а неки доспјевају до лишћа, плода, сјемења гдје могу да се акумулирају (Stojiljković et al. 2018). Биљке су за људе примарни извор транспорта неорганских хранљивих материја из земљишта, док су производи од животиња (месо, млијеко, јаја) други извор ових елемената. Због штетног дејства токсичних метала по здравље људи неопходно је да се врши стално праћење нивоа загађења, како хране тако и подземних и површинских вода. У РС постоје регулативе („Службени лист СРЈ“, број 5/92, 11/92 и 32/02), које се односе на садржаје ових контаминената у различитим врстама прехранбених производа, чиме се и регулише унос ових контаминената у људски организам. Уколико концентрације ових полутаната прелазе прописане границе постоји реална опасност по људско здравље. Пuteви уноса и концентрације тешких метала у појединим врстама хране, као и ткива и органи у којима се ови метали депонују, представљени су у Табели 18.1.

Табела 18.1. Концентрације тешких метала у појединим намирницама као и ткива и органи у којима се ови метали депонују

Table 18.1. Concentrations of heavy metals in certain food as well as tissues and organs in which these metals are deposited

	Токсични метали			
	Арсен	Кадмијум	Олово	Жива
Дневни унос путем хране и концентрација (mg/kg)	0-0,29	<0,01-0,1	<0, 1-0,2	<0,02-0,1
Процент апсорпције, %	>90	3-10	5-10	90
Условно прихватљив недељни унос mg/kg одрасле особе	0,015	0,007	0,025	0,005
Путеви уноса преко хране и концентрација (mg/kg)	Морски плодови: 3-37 Вино: 0,02-0,11	Месо, спанаћ: 0,06 Свињске изнутрице: 0,18-1 Воће: 0,005-0,01	Поврће: 0,005-0,65 Житарице, сир: 0,03 Месо, риба, живина: 0,002-0,16	Риба и рибљи производи: 0,09-1,2
Ткива и органи у којима се депонују	Јетра, бубрези, кожа, коса, нокти	Јетра, бубрези, кости	Јетра, бубрези, кости, мозак, аорта	Бубрези, кости, мозак, паратиорид на жлезда

Постоје бројна истраживања о присутности тешких метала у намирницама и о њиховом штетном дејству по здравље (Dehelean and Magdas 1989; López-Alonso 2007; Jarić et al. 2011; Ghosh et al. 2013; Magdas 2013; Petrović et al. 2015, Petrović et al. 2016; Fathabad et al. 2018; Stojiljković et al. 2018; Nikolić et al. 2019; Savić et al. 2019). Хронична изложеност фармских животиња дејству тешких метала, посебно олова и кадмијума, као и њихова концентрација у ткивима, постају предмет интензивније контроле. Налази нивоа олова у крви код мале дјеце (Bergdahl et al. 1999), указала су на контаминацију дјечије хране овим контаминентом. Млијеко и производи од млијека, као неизоставна компонента исхране људи, посебно дјеце у расту, представља потенцијални ризик за људску популацију, уколико садрже токсичне елементе (Petrović et al. 2016). Контаминација оловом примијећена је и приликом анализе бистрих сокова и чајева камилице (Savić et al. 2015; Petrović et al. 2015) и код многих других намирница. Преглед истраживања различитих

намирница примјеном ICP методе индентификације тешких метала дат је у Табели 18.2.

Tabela 18.2. Литературни преглед одређивања тешких метала у различитим узорцима хране примјеном ICP-OES методе

Table 18.2. Literature review of heavy metals determination in different food by ICP-OES method

Тешки метали	Врста хране	Литература
Cu, Zn, Mn, Ni, Cd, Pb	Млијеко	Petrović et al. (2016)
Co, Cu, Zn, As, Cd	Сокови	Dehelean and Magdas (2013)
Cu, Zn, Ni, Cd, Pb	Чајеви	Petrović et al. (2015)
Cd, As, Pb, Cr, Se	Месо	López-Alonso (2007)
Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	Вино	Eschnauer et al. (1989)
Hg, As, Pb	Биљни материјал	Stojiljković et al. (2018)
Al, Sn, Pb, As, Cd, Hg	Воће	Fathabad et al. (2018)
Pb, Ni, Al, Cd	Зачини	Savić et al. (2019)
Zn	Брашно	Nikolić et al. (2019)
Al, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Li	Риба	Janjić et al. (2011)
Pb, Cd, Ni	Поврће	Ghosh et al. (2013)

18.4. Хроматографске технике у анализи хране

Квалитет хране се посљедњих неколико деценија интензивно прати примјеном све унапређенијих хроматографских техника, како путем провјере квалитета и аутентичности хране (присуства неопходних конституената хране и њихових деривата), тако и детекцијом и квантификацијом токсичних материја које се могу наћи у храни. Као илустрација широке примјене једне од хроматографских метода у успону и праћењу квалитета хране, Табелом 18.3 је дата листа компоненти хране које се могу раздвајати и анализирати путем течне хроматографије суперкритичних флуида (SFC - *енг.* Supercritical Fluid Chromatography). Једна од најмоћнијих и најкоришћенијих метода за праћење квалитета хране је течна хроматографија комбинована са масеном спектрометријом, LC/MS - *енг.* Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, којом је нпр. одређивање присуства антиоксиданаса - полифенолних једињења у разним узорцима хране (Lucci et al. 2017), или пак присуства хлорофила и његових деривата у различитим врстама маслиновог уља (Roca et al. 2003; Giuliani et al. 2011) као мјерило аутентичности хране, одавно већ рутина. Са друге стране, токсичне супстанце које се могу наћи у храни, а чије је праћење присутности од великог значаја, могу се подијелити у више група:

- токсини из индустријског отпада у које спадају хлоровани угљоводоници, полициклични ароматични угљоводоници (ПАХ-ови) и тешки метали

- остаци третирања биљака и животиња у које спадају резидуе ветеринарских љекова и пестицида
- токсини биљног поријекла
- токсини животињског поријекла
- токсини гљива
- микотоксини
- материје које настају током прераде хране у које, између осталог, спадају акриламид, фуран, ПАХ-ови, хлорпропаноли, етил карбамат
- материје које се додају у храну (адитиви), као што су конзерванси (надзор микробиолошког кварења), антиоксиданси (спречавање аутооксидације масти), секвестранти (вежу метале у комплексе (фосфати, ЕДТА) и тиме спречавају њихов каталитички ефекат на оксидацију масти и других састојака), сурфактанти (површински активне материје), стабилизатори (спречавају таложење и раслојавање; нпр. скроб, карагенан и друге гуме), средства за избјељивање, средства за дозријевање, пуфери, киселине, базе, боје, заслађивачи, хранљиви додаци, природни и синтетички побољшивачи укуса и друго.

Управо због веома великог броја најразличитијих контаминаната присутних у храни, предмет овог дијела поглавља биће управо они који су по нашем мишљењу и најраспрострањенији, као што су резидуе пестицида и перфлуорирани угљоводоници (мада и у оквиру ових нешто суженијих група, широк је спектар појединачних супстанци). Хроматографија је одувijek имала велики утицај на откривање и детекцију токсичних супстанци у храни, посебно развојем хроматографија високих перформанси подржаних моћним детекторима као што су детектори масене спектрометрије (MS). Хроматографске технике које су широко у употреби када је ријеч о праћењу квалитета хране јесу течна хроматографија високих перформанси комбинована са детекторима типа UV-VIS (DAD - *енг.* Diode Array Detection) и MS, као и гасна хроматографија, такође комбинована са детекторима масене спектрометрије, управо због њихове једноставности примјене, ефикасности, минималне количине потребног узорка за анализу, али и високе осјетљивости примјењених детекционих система.

Модерна пољопривредна производња подразумијева употребу многих пестицида за контролу штеточина и болести, као и за повећање приноса. Оваква примјена хемикалија, иако корисна у производњи биља, резултирала је широком распрострањеношћу контаминације еколошки важних средина, као што су површинске воде и ресурси подземних вода, земљиште или ваздух, као и усјеви у којима се примјењују. У коначном исходу, остаци пестицида заостају у храни. Иначе, анализом остатака пестицида у узорцима хране и животне средине, већ око 40 година баве се бројне лабораторије у свијету (Martínez Vidal et al. 2006). Поред остатака пестицида, полициклични ароматични угљоводоници (ПАХ) су у великој мјери присутни у животној средини, а њихова биохемијска постојаност чини их отпорним на деградацију. Велика еколошка забринутост везана за присуство ПАХ-

ова потиче од чињенице да су они високо токсични и да имају мутагена и канцерогена својства (Johnsen et al. 2005; Monna et al. 1993). Као што је већ претходном класификацијом токсина које је могуће наћи у храни, тј. контаминаната хране означено, ПАХ-ови могу доспјети у храну на два начина, како из природе и индустрије, тако и приликом припреме хране, што укључује печење хране или неки други поступак термичке обраде хране (Marković i sar. 1996).

Табела 18.3. Компоненте хране раздвојене и анализирани примјеном SFC (King 2000)
Table 18.3. The food compounds separated and analyzed by SFC (King 2000)

Угљени хидрати	Дериватизовани сирупи кукуруза, манозни глукани
Хирална једињења	Монотерпени, пиразини
Лијекови/Антибиотици	Кофеин, еритромицин, полициклични етерични антибиотици, сулфонамиди,
Угљоводоници	Сесквитерпени, сквален, воскови и естри воскова
Липиди	Масне киселине, естри масних киселина, моноглицериди, диглицериди, триглицериди, естри стерола, стероли (холестерол), липосолубилни витамини, токофероли, фосфолипиди (лецитин), липидни хидропероксиди, гликолипиди
Уља/масти	Уље целера, кокоса, рибе, соје, пшеничних клица, палмино уље, уље риже, млијеко/сир триглицериди
Амбалажа/филм компоненте	Олигомери полипропилена, поливинил хлорид, фенолни антиоксиданси, нискомолекуларни полистирен
Пестициди	Халогеновани, органофосфорни, карбамати, кисели фенокси хербициди, сулфонилуреа
Пигменти	Каротеноиди, ксантофили
Посебни инградијенти	Компоненте хмеља
Зачини	Паприка, кардамон, кумарин, кари, рузмарин, ванилин
Терпени/есенцијална и воћна уља	Уље грејпфрута, лимун, мента
Други токсини	Микотоксини, нитрозамини, полициклични ароматични угљоводоници

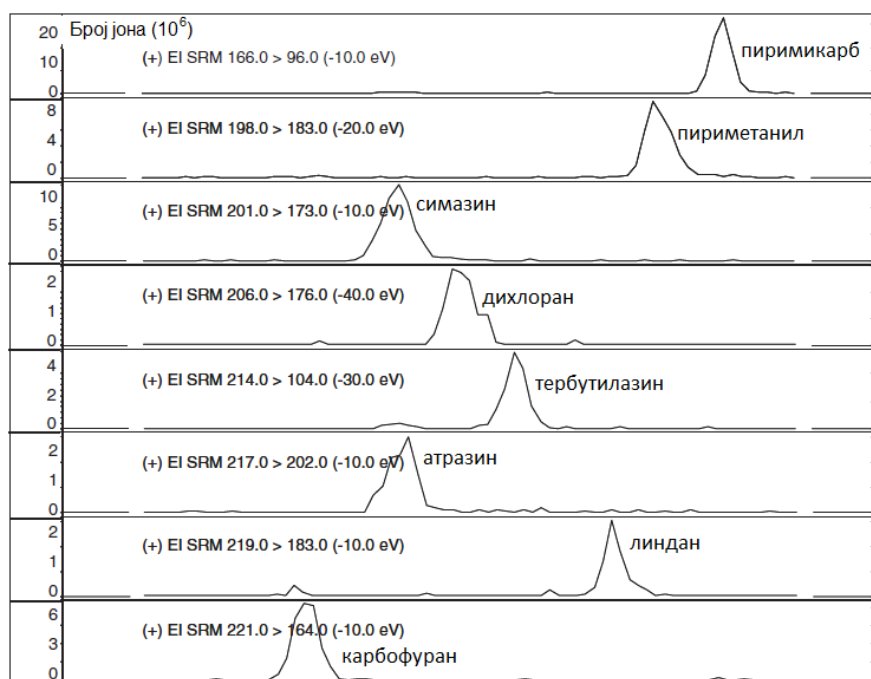
Основни задатак примјене аналитичких метода у анализи хране је да детектује и мјери резидуе присутне у узорцима хране на веома ниским нивоима концентрације, као и пружање недвосмислених доказа о идентитету и количини било ког детектованог молекула, тј. молекула од интереса.

18.4.1. Гасна хроматографија, GC

Гасна хроматографија куплована са масеном спектрометријом (GC/MS - енг. Gass Chromatography/Mass spectrometry) је већ широко у употреби за одређивање остатака пестицида у свјежем поврћу и воћу (Arrebola et al. 2003a; 2003b; Štajnbaher and Zupančič-Kralj 2003; Lüthje et al. 2005; Leandro et al. 2005; Abdala et al. 2018), као и ПАХ-ова у различитим узорцима (Varlet et al. 2007; Jira et al. 2008; Drabova et al. 2012; Zelinkova and Wenz 2015). Употреба тандем масене спектрометрије (MS/MS) побољшава селективност технике, понекад са драстичним смањењем позадинских, „background“ ефеката и без губитка способности идентификације. Омогућава анализу пестицида и других контаминаната у траговима, у присуству многих интерферирајућих једињења која могу бити сметња (McLafferty 1983; de Hoffmann and Stroobant 1999). Тандем гасно-масена спектрометријаска метода, GC/MS/MS, посебно је корисна за анализу комплексних смјеша, јер омогућава раздвајање и идентификацију компоненти различитих структура елуираних на сличним ретенционим временима, различитих концентрација. Ипак, MS/MS техника захтијева примјену специфичних експерименталних услова током времена елуирања циљаног анализата. Из тог разлога, ограничен број супстанци може се одредити за неко разумно вријеме анализе. Такозвани „ion trap“ масени спектрометар, тј. детектор са јонском замком (ITD - енг. Ion Trap Detector) је раније предложен за одређивање остатака пестицида у поврћу. Међутим, број анализата који су могли да се истовремено одреде у MS/MS режиму је био ограничен на 5 до 6 (González Rodríguez et al. 2002). Ово ограничење доводи до дугог времена за анализу комплексних смјеша са великим бројем компоненти од интереса, тј. резидуа пестицида. Употребом троструког квадруполног масеног спектрометра рјешено је ово техничко ограничење, јер овакав инструмент може да анализира 25-30 анализата у исто вријеме (Garrido Frenich et al. 2005) избором фрагментационог пута у масеном детектору који је од интереса, тј. SRM - енг. Selected Reaction Monitoring. Овај режим скенирања је бржи од скенирања производа реакције доступан на „ion trap“ детектору. Једна од метода за симултану идентификацију и квантификацију чак 130 различитих остатака пестицида за само 12 минута трајања анализе (и укупно 30 минута заједно са идентификацијом и квантификацијом), са само једним ињектирањем узорка у хроматограф, предложена је од стране Martínez Vidal-а и сарадника (Martínez Vidal et al. 2006). На Слици 18.6 приказани су хроматограми снимљени примјеном SRM технике за неке од елуираних пестицида (Martínez Vidal et al. 2006).

Комбинована употреба гасне хроматографије и високорезолуционе масене спектрометрије тренутно је једна од најефикаснијих стратегија за анализу органских загађивача (Hernández et al. 2012). У широком спектру метода за анализу органских контаминаната, број могућности је неограничен приликом анализе добијених података, јер поред могућности које дају скенирања у цјелокупном опсегу m/z вриједности, анализатор типа „time of flight“ (TOF) је посебно погодан у ове сврхе због високе осјетљивости и прецизности одређивања масе. Додатно,

модерне GC/TOF/MS методе користе јонизационе системе са меком, тзв. „soft“-јонизацијом на атмосферском притиску, као што је (APCI - енг. Atmospheric Pressure Chemical Ionization), истраживања циљаних једињења су лакша и ефикаснија (Portoles et al. 2014). Комбиновања са експериментима типа MS/MS или MSⁿ, дају могућности даље идентификације једињења, захваљујући информацијама о структури које дају путеви фрагментације. Примјер примјене овакве методе за идентификацију више од 130 пестицида и 24 ПАХ-ова дали су Náchер-Mestre и сарадници (Náchер-Mestre et al. 2014) на узорцима хране и рибљег ткива. На крају, постоји и високобрзинска гасна хроматографија, тј. гасна хроматографија високих брзина, HSGC (енг. High Speed Gas Chromatography) која се може примјењивати у анализи и карактеризацији смјеша токсиканата из хране, као што су хлоровани пестициди и ПАХ-ови (Hada et al. 2000).



Слика 18.6. Хроматограми снимљени истовремено коришћењем SRM технике за неке од елуираних пестицида. Сваки хроматограм је добијен мониторингом изабраног јона за квантификацију, за сваки пестицид понаособ. Колона за хроматографију је капиларног типа (дужина 30 m, унутрашњи пречник 0,25 mm и дебљина филма 0,25 mm); гас носилац је хелијум уз проток од 1 mL/min. Гасни хроматограф је повезан са троструким квадруполним детектором и електрон-јонизационим извором (EI - енг. Electron ionization, 70 eV). Репродуковано из: Martínez Vidal et al. 2006.

Figure 18.6. The chromatograms simultaneously measured by SRM techniques for some of the eluted pesticides. Each chromatogram is measured by selected ion monitoring of each pesticide. The capillary column was used (30 m long, 0.25 mm of inner diameter and 0.25 mm of film thickness); helium as a carrier gas was used in 1 mL/min flow rate. The gas chromatograph was coupled with triple quadrupole detector and electron-ionization source (70 eV) (from Martínez Vidal et al. 2006.)

Како било, HSGC-метода има нову инструментацију у односу на класичну гасну хроматографију, прије свега нова пуњења колона (унутрашњег пречника $\leq 0,1$ mm) са носачима типа микро-честица, затим нове начине за брзо загријавање колона, методе „двоструких колона“ за бољу селективност, као и масено-спектрометријску детекцију типа „time of flight“ за карактеризацију „брзе“ реакционе смјеше (Marković i Zvezdanović 2012).

18.4.2. Течна хроматографија, LC

Хроматографија високих могућности или високопритисна течна хроматографија (HPLC - енг. High Performance/Pressure Liquid Chromatography) спада у ред хроматографија код којих течна мобилна фаза функционише под високим притиском, што управо представља основ за високе могућности ове хроматографије. Са једне стране, висок притисак омогућава континуиран проток мобилне фазе и успостављање „квалитетне“ динамичке равнотеже са стационарном фазом, која је услов добре селективне расподеле компоненти датог узорка. Са друге стране, висок притисак омогућава брзо и ефикасно елуирање раздвојених компоненти смјеше из колона. Величина честица стационарне фазе за класичну HPLC хроматографску колону је најчешће 5 μm . Примјеном HPLC хроматографије и различитих колона (Singh et al. 2019), могуће је одређивати присуство ПАХ-ова у узорцима чоколаде (Kumari et al. 2011), какао маслаца (Sess-Tchotch et al. 2018), чајева и кафе (Shi et al. 2016), грилованог и димљеног меса (Silva et al. 2018), али и других контаминаната и састојака у најразличитијим узорцима хране као што је присуство пестицида у узорцима меда (Jovanov et al. 2015), меса (Gutiérrez-Valencia and de Llasera 2017), храни богатој мастима - млијека и млијечних производа, различитих уља, рибе, маргарина, орашастих плодова, сјемена (Madej et al. 2018). Убрзани развој технологије материјала за паковање хроматографске колона, коришћење „малих честица“ ($<5\mu\text{m}$) и њихов утицај на квалитет раздвајања допринијели су развоју нових инструмената који то технички подржавају. На овај начин, коришћењем мањих честица, брзина и капацитет пикова могу бити проширени до нових граница, што и добија свој нови назив – U(H)PLC (енг. Ultra (High) Performance Liquid Chromatography), тј. „течна хроматографија изузетних могућности“. Оваква варијанта („технологија малих честица“) преузима преимућство у течним хроматографијама због повећане брзине анализе, изванредне резолуције и осјетљивости, поготову када се комбинује са детекторима масеног типа (Marković i Zvezdanović 2012).

У зависности од крајњег циља свака анализа може бити *targeted* или *non-targeted* (Garcia-Reyes et al. 2007). *Targeted* анализа представља конвенционалну анализу која се заснива на развоју методе уз употребу стандарда прије анализе и праћења стварних узорака у којима састав није дефинисан. Одабир стандарда се врши на основу токсичности и/или учесталости детекције. Најновији тренд у оквиру *targeted* анализе је развој *large-scale* мултирезидуалне методе (способне да

одреди више од 80 једињења). Ове методе се заснивају на употреби LC–MS/MS методе, коришћењем QqQ (Triple quadrupole), QLT и TOF–MS (time-of-flight MS) масених детектора. LC–MS/MS метода која за масени детектор има триплквадропол (QqQ), има озбиљно ограничење у погледу броја једињења која се могу истовремено одређивати (најчешће је од 100 до 150) у зависности од брзине скенирања/времена задржавања. Конвенционални триплквадропол инструменти (са умјереном брзином скенирања), дозвољавају максимално истовремено снимање од око 10 до 20 прелаза са задовољавајућом осјетљивошћу. Ово ограничење се може успјешно превазићи коришћењем инструмената новије генерације, који могу смањити вријеме задржавања за сваку транзицију без икаквог губитка осјетљивости, чиме се истовремено повећава број прелаза до 100 или 150. Овакви брзоокидајући QqQ–MS инструменти значајно повећавају број анализата који се могу детектовати у једном циклусу (Kovalczuk et al. 2006).

Недавно представљен хибридни QLT инструмент је такође коришћен у комбинацији са течном хроматографијом за извођење MS/MS анализе. Овај инструмент задржава класичне модове триплквадропола за квантитативну и квалитативну анализу (*SRM mode* и *neutral loss scan*) и комбинује их са осјетљивим скенирајућим модовима јонске замке за потврду анализата или карактеризацију непознатих, укључујући и побољшани мод за јонске производе, временско кашњење фрагментације и MS³ са већим капацитетом акумулације јона од конвенционалног тродимензионалног анализатора јона. QqLIT (quadrupole linear ion trap) анализатор може додатно да обезбједи побољшану осјетљивост за чак и до 200 једињења која се могу анализирати у једном LC–MS/MS испитивању са 2 SRM прелаза (García-Reyes et al. 2007). Режији рада (побољшани мод за јонске производе и MS³) су корисни за недвосмислену потврду присуства пестицида који имају слабу фрагментацију при ниским нивоима концентрације, што се не може лако потврдити употребом триплквадропол инструмената због високог SRM односа између ова два прелаза (или одсуства друге транзиције).

За разлику од QqQ и QqLIT анализатора, ТОФ има способност да забиљежи неограничен број једињења када ради у *full-scan* моду. Измјерена тачна маса је скоро специфична за сваки аналит, и универзална без обзира на коришћени инструмент, што омогућава развој претраживачке библиотеке упоредиве са онима које већ постоје за гасну хроматографију (GC–MS). У том смислу, UPLC–TOF–MS је исплатива техника која је веома погодна за развој стратегије скрининга и спровођења рутинске анализе тачних маса на основу базе података (Mezcua et al. 2009). Друга главна карактеристика ТОФ–МС инструмената је његова висока осјетљивост у “full-scan” моду, тако да се пестициди могу детектовати у сложеним матрицама чак и при ниским пикограмским нивоима. Поред тога, LC–TOF–MS обезбјеђује и задовољавајуће аналитичке перформансе за потребе квантификације, као што је то већ одавно показано у литератури (Gilbert-Lopez et al. 2007; Mezcua et al. 2009).

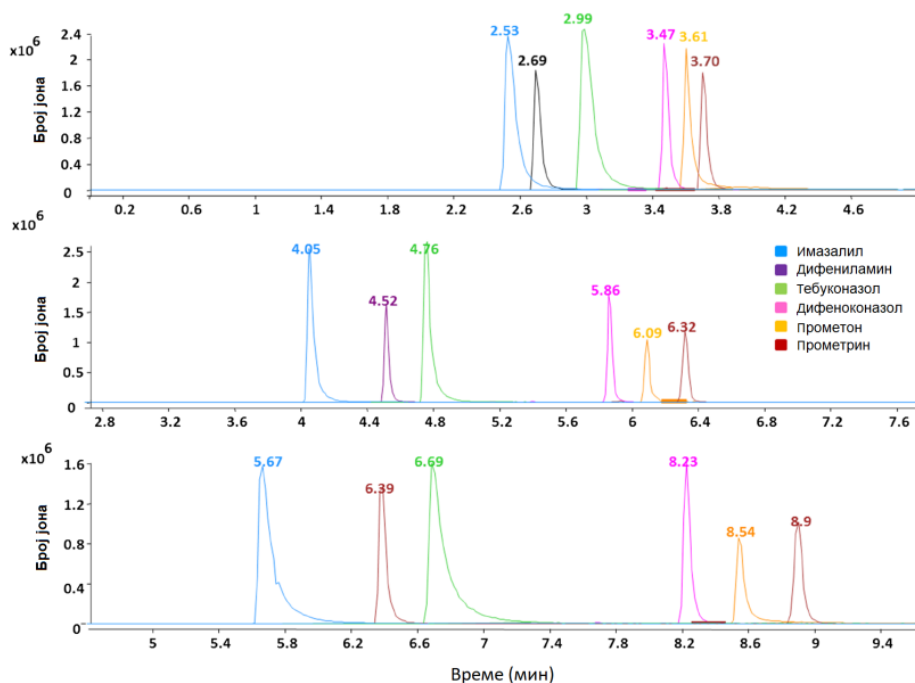
Non-target анализа покрива могућност детекције било ког једињења повезаног или не са пестицидима присутним у узорку. *Non-target* анализа нуди могућност

идентификације и неочекиваних пестицида, производе трансформације и/или нечистоће, или чак нежељена једињења која могу бити токсична. Ова анализа је компликованија јер захтева идентификацију непознатих једињења. Прије неколико година, потенцијал LC–TOF-MS за *non-target* анализу је показан идентификацијом имазалила и производа разградње прохлораза (Thurman et al. 2005). Ова идентификација је остварена комбиновањем информација добијених примјеном прецизног масеног анализатора LC–TOF-MS-а и LC-ion trap MSⁿ детектора на основу кога је додатно расвијетљен фрагментациони пут. Даља, елегантна аналитичка методологија за проучавање и расвијетљавање производа разградње пестицида у храни развијена је проучавањем повезаности односа “фрагментација-деградација”.

Међутим, још једном је потврђено да QqTOF анализатор има предности у односу на LC-ion trap MSⁿ детектора, јер обезбјеђује додатне функције за потврду непознатог једињења, као што су тачни масени спектри јонских продуката након извођења MS/MS експеримената. Неколико студија пореди предности и недостатке неколико масених анализатора, наглашавајући способност QqTOF-а да идентификује метаболите и непозната једињења против других анализатора масе (Soler et al. 2007). QqTOF је недавно примјењен и за одређивање остатака пестицида у храни (Pico et al. 2007; Soler et al. 2007; Grimalt et al. 2007; Portoles et al. 2009). Студије метаболита фентиона у поморанцама и производи деградације амидраза у крушкама KqTOF (Pico et al. 2007; Pico et al. 2008). Идентификовано је неколико метаболита и били су коначно потврђени тачним масеним спектрима продукта без референтних стандарда. Друге занимљиве студије (Grimalt et al. 2007) идентификовале су оксидацију метаболита бупрофезина у узорцима коре од банана. У овом случају, употреба инструмента QqTOF била је од кључног значаја за правилно разјашњење овог метаболита. Pico се са својим сарадницима (2007) бавио се употребом UPLC–QqTOF-MS да идентификује остатке пестицида присутних у комплексним екстрактима (Pico et al. 2007). На овај начин, успјешно су идентификовани карбендазим, имазалил и етоксиквин у екстрактима крушке због прецизног одређивања масе њихових протонираних молекула и њихових главних фрагмената масени спектри производа.

Једна од аналитичких метода за детекцију, квантификацију и потврђивање групе од 100 различитих пестицида у воћним узорцима, развијена је коришћењем течне хроматографије у комбинацији са тандем масеном спектрометријом (LC/MS²) која укључује MRM анализу јона, од стране Ferrer-а и сарадника (Ferrer et al. 2007). Истраживани пестициди могу да припадају различитим хемијским фамилијама хербицида, инсектицида и фунгицида, као и неким производима њихове разградње. Мала величина честица хроматографске C18 колоне (1,8 mm) је коришћена за раздвајање смјеше, обезбјеђујући веома узане пикове у хроматограмима и одлично раздвајање свих анализа у периоду од 30 минута, за максимални капацитет пика. Метода је укључила примјену 0,1% мравље киселине, у води и у ацетонитрилу, као два растварача који чине елуент, у њиховом градијентном режиму елуирања, док су услови јонизационе технике примијењене у масеном детектору карактеристична „мека“ електроспреј јонизација (ESI - енг.

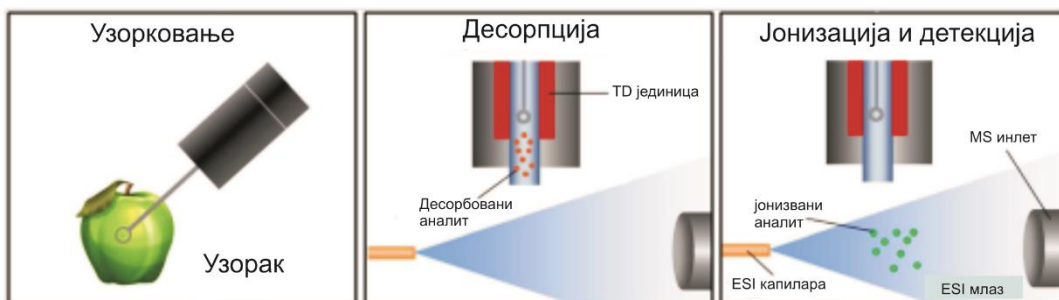
Electro Spray Ionization). Многе друге методе које укључују примјену течне хроматографије са детекторима масене спектрометрије су развијене за анализу (квалитативну и квантитативну) широког спектра, што конституената хране као показатеља исправности и аутентичности хране, тако и контаминаната (Pérez-Ortega et al. 2017), као што су ПАХ-ови у узорцима кокоса, јабуке, ланеног уља, сјеменки сунцокрета (da Silva et al. 2018), пршуте (Peromingo et al. 2018), пестициди у узорцима зеленог чаја (Huang et al. 2017), сока од наранџе (Rizzetti et al. 2016), млијека (Lachat and Glauser 2018), пиринча (da Silva et al. 2019). На Слици 18.7 приказани су јон хроматограми неколико пестицида детектованих у узорцима наранџе (Pérez-Ortega et al. 2017).



Слика 18.7. Екстраховани јон хроматограми неколико пестицида детектованих у узорцима наранџе са три различита елуациона градијента са 0,1 % vol мравље киселине у води и ацетонитрилу у саставу елуента. Колона је типа C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,8 μm); UHPLC систем је повезан са квадруполним „time-of-flight“ масеним спектрометром са електроспреј јонизационим извором. Детектоване компоненте су редом: имазалил (1), дифениламин (2), тебуконазол (3), дифеноконазол (4), прометон (5) и прометрин (6) (100 μg dm⁻³). Репродуковано из: Pérez-Ortega et al. (2017)

Figure 18.7. The extracted ion chromatograms of some pesticides detected in orange samples by three different gradient programs with 0.1% vol of formic acid in water and acetonitrile as an eluent. The C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used; UHPLC system was coupled with quadrupole “time-of-flight” mass spectrometer equipped with electrospray ion source. Imazalil (1), diphenylamine (2), tebucanazole (3), difenoconazole (4), prometon (5) and prometryn (6) were identified in concentration of 100 μg dm⁻³ (from Pérez-Ortega et al. 2017)

Коришћење конвенционалне течне хроматографије комбиноване са детекторима масене спектрометрије оптерећена је често напорном и неодговарајућом предобрадом узорка. Са друге стране, само примјена електроспреј јонизационе масене спектрометрије са топлотном десорпцијом (TD - енг. Thermal Desorption) која је позната по својим брзим, једноставним и осјетљивим могућностима детекције нашла је своју примјену у анализи пестицида из узорака хране (Shiea et al. 2015). Наиме, за добијање анализата (резидуа пестицида) из узорака хране, користи се сонда за директно узорковање, која се поставља преко чврстих површина узорака (воћа или поврћа) или потопљена у течности (у којој се налази узорак). Сонда се затим убацује у загријану TD јединицу која се налази уз ESI извор, одакле се десорбовани анализат директно јонизује у јонском извору, одакле иде даље на MS детекцију. Пошто се анализа спроведена на овакав начин врши без предтретмана, све траје око 15 сек, а аутори су добили масене спектре за 22 пестицида, уз одговарајући лимит детекције до $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$. Захваљујући кратким временима трајања анализе, описана техника омогућава широку примјену када је потребна брза детекција пестицида на великом броју узорака. Шематски приказ инструментације узорковања и ињектирања узорака резидуа пестицида са површина воћа и поврћа путем TD-ESI MS технике дат је на Слици 18.8 (Shiea et al. 2015).



Слика 18.8. Шематски приказ инструментације узорковања и ињектирања узорака резидуа пестицида са површина воћа и поврћа путем TD-ESI MS технике. Репродуковано из: Shiea et al. (2015)

Figure 18.8. Schematic representation of pesticides residue sampling and injection by TD-ESI MS techniques from fruits and vegetables surface (from Shiea et al. 2015)

Поред описаних широко коришћених метода за одређивање различитих врста контаминаната у узорцима хране, може се користити и мултидимензионална течна хроматографија (Campíns-Falcó and Herráez-Hernández 2000) чија је основна карактеристика употреба двије или више хроматографских колона у једној анализи. Предности оваквог приступа анализи у односу на једноколону хроматографију су побољшање детектабилности анализата и моћи раздвајања, као и опште призната потреба за повећањем пропусности узорка. У том смислу, главне примјене мултидимензионалних система су у пречишћавању анализата и

обогаћивању и побољшању процеса раздвајања (на примјер, повећањем дужине колоне или скраћивањем времена анализе). Осим тога, ови системи могу бити дизајнирани тако да постижу различите циљеве у оквиру хроматографске мреже, као нпр. употреба јоноизмјењивачких стационарних фаза у комбинацији са класичним реверзно-фазним колонама за селективно раздвајање поларних пестицида екстрахованих из природних узорака (Campíns-Falcó and Herráez-Hernández 2000).

Микотоксини представљају посебан проблем код пољопривредно-прехранбених производа, јер настају као резултат синтезе бројних врста гљива. Примјена LC-MS методе је омогућила развој мулти-резидуалних метода, које су погодне за идентификацију више структурно различитих токсина у једном хроматографском циклусу. Потреба за таквим мулти-резидуалним методама се налази у чињеници да једна гљивична врста може произвести неколико различитих токсина, а да један пољопривредно-прехранбени производ може бити контаминиран различитим гљивичним врстама које заједничким појављивањем укупно доводе до стварања више различитих токсина. У овако комплексним ситуацијама најбоље је користити течну хроматографију у комбинацији са триплквардрополом. Комбиновањем оваква два система развијене су мулти-резидуалне методе за истовремено одређивање и до 86 анализата укључујући и трихотецене (ниваленол, деоксиниваленол, 3-ацетилдооксиниваленол, 15-ацетилдооксиниваленол, неосоланиол, фусаренон-Кс, диацетоксирпенол, ХТ-2 токсин, Т-2 токсин), афлатоксини (афлатоксин-Б1, афлатоксин-Б2, афлатоксин-Г1 и афлатоксин-Г2), *Alternaria* токсини (алтернариол, алтернариол метил етар и алтенуен), фумонизини (фумонизин-Б1, фумонизин-Б2 и фумонизин-Б3), охратоксин А, зеараленон, беауверицин и стеригматоцистин у јајима, маслиновом уљу, житарицама, воћу, поврћу, сиру, орасима, џему и дјечјој храни (Cavaliere et al. 2007; Sulyok et al. 2007; Santini et al. 2009; Monbaliu et al. 2009).

18.5. Закључак и препоруке за будућа истраживања

Изузетно велики захтјеви у анализи хране који подразумевају очување интегритета ланца снабдијевања храном, али и превенирање и откривање свих могућих злоупотреба, воде ка непрестаном усавршавању спектроскопских и хроматографских техника које једино могу одговорити све захтјевнијим условима. Инфрацрвеном, Раманском, флуоресцентном и оптичком емисионом спектроскопијом је могуће брзо и директно пратити хемијску исправност свих врста намирница, али и откривање „отиска прстију“, тј. специфичног једињења које гарантује поријекло и идентитет хране. Присуство пестицида, хербицида, хемијских контаминаната, тешких метала, чак и микробиолошка исправност хране, се може брзо и ефикасно пратити описаним спектроскопским техникама.

Упоредо са спектроскопским континуирано се развијају и хроматографске методе као најсавршеније аналитичке технике данашњице. Течна и гасна хроматографија комбиноване са масеном спектрометријом су апсолутни императив за сваку

детаљну анализу хране у модерном добу. Оне су развијене до таквих висина да практично не познају ограничења у смислу комплексности узорака и детекције одређене врста једињења. Међутим, стално усавршавање и надоградња спектроскопских и хроматографских техника у циљу повећања њихове осјетљивости, прецизности и ефикасности је процес који се, развојем нових материјала и техничко-технолошких достигнућа, несумњиво никад неће зауставити.

Литература

- Abdala AA, Afify AS, Hasaan IE and Mohamed A (2018) Studying the Effect of household-type treatment and processing on the residues of ethion and profenofos pesticides and on the contents of capsaicinoids in green chili pepper using GC-MS/MS and HPLC. *Food Analytical Methods* 11: 382–393
- Arrebola FJ, Martínez Vidal JL, González Rodríguez MJ, Garrido Frenich A, Sanchez Morito N (2003a) Reduction of analysis time in gas chromatography. Application of low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of pesticide residues in vegetables. *Journal of Chromatography A*. 1005: 131-141
- Arrebola FJ, Martínez Vidal JL, Mateu-Sánchez M, Alvarez-Castellón FJ (2003b) Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography–chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Analitica Chimica Acta*. 484: 167-180
- Balabin M and Smirnov V (2011) Melamine detection by mid- and near-infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. *Talanta* 85: 562–568
- Beganović A, Hawthorne LM, Bach K and Huck CW (2019) Critical Review on the Utilization of Handheld and Portable Raman Spectrometry in Meat Science. *Foods* 8(49): 2-18
- Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schütz A, Buchanan LH, Ortega F, Laurell G and Skerfving S (1999) Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environmental research* 80: 25-33
- Campíns-Falcó P and Herráez-Hernández R (2000) Multidimensional Chromatography In: Wilson ID, Adlard ER, Cooke M and Poole CF (Eds.) *Encyclopedia of separation science*. Academic Press, pp 738-747
- Cavaliere C, Foglia P, Guarino C, Motto M, Nazzari M. Samperi R, Laganá A and Berardo N (2007) Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105: 700–710
- Cheng J, Zhang S, Wang S, Wang P, Su X-O and Xie J (2019) Rapid and sensitive detection of acrylamide in fried food using dispersive solid-phase extraction

- combined with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry* 276: 157–163
- Chen CY, Stemberger RS, Klaue B, Blum JD, Pickhardt PC, Folt CL (2000) Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. *Limnology and Oceanography* 45: 1525-36
- Cozzolino D (2016) *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies Improving Quality Throughout the Food Chain*. In: Espineira M and Santaclara F (Eds) *Technology and Nutrition Woodhead Publishing Series in Food Science*, Woodhead Publishing, pp. 119-136
- Craig P, Franca S and Irudayaraj J (2014) Vibrational spectroscopy for food quality and safety screening. In: Bhunia A, Kim M, Taitt C (Eds) *High Throughput Screening for Food Safety Assessment*. Woodhead Publishing, pp. 166-194
- da Silva LP, Madureira F, de Azevedo Vargas E, Faria AF and Augusti R (2019) Development and validation of a multianalyte method for quantification of mycotoxins and pesticides in rice using a simple dilute and shoot procedure and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 270: 420–427
- da Silva SA, da Silva Torresa EAF, de Almeida AP and Sampaio GR (2018) Polycyclic aromatic hydrocarbons content and fatty acids profile in coconut, safflower, evening primrose and linseed oils. *Food Chemistry* 245: 798–805
- Dankowska A (2016) *Advances in Food Authenticity Testing*. In: Downey G (Ed) *Technology and Nutrition) Woodhead Publishing Series in Food Science*, pp. 117-145
- de Hoffmann E, Stroobant V (1999) *Mass Spectrometry. Principles and Applications* (2nd edn). John Wiley, Paris
- de Santana FB, Neto WB, Poppi RJ (2019) Random forest as one-class classifier and infrared spectroscopy for food adulteration detection. *Food Chemistry* 293: 323–332
- Dehelean A and Magdas DA (2013) Analysis of mineral and heavy metal content of some commercial fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry. *The Scientific World Journal*, 6 pages, Article ID 215423, Volume 2013
- Dong D, Zheng W, Wang W, Zhao X, Jiao L and Zhao (2014) Analysis and discrimination of grape spoilage via volatiles: a comparison between long optical path Fourier-transform-infrared spectroscopy and sensor arrays. *Analyst* 139 (19): 5028-5034
- Drabova L, Pulkrabova J, Kalachova K, Tomaniova M, Kocourek V and Hajslova J (2012). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry. *Talanta*. 100: 207-216
- Eschnauer H, Jakob L, Meierer H, Neeb R (1989) Use and limitations of ICP-OES in wine analysis. *Microchimica Acta* 99: 291-8
- Fathabad AE, Shariatifar N, Moazzen M, Nazmara S, Fakhri Y, Alimohammadi M, Azari A and Khaneghah AM (2018) Determination of heavy metal content of processed fruit products from Tehran's market using ICP-OES: a risk assessment study. *Food and chemical toxicology* 115: 436-46

- Ferrer I, Thurman EM and Zweigenbaum JA (2007) Screening and confirmation of 100 pesticides in food samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 3869–3882
- Garcia-Reyes JF, Hernando MD, Ferrer C, Molina-Diaz A and Fernandez-Alba AR (2007) Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79: 7308-7323
- Garrido Frenich A, González Rodríguez MJ, Arrebola FJ and Martínez Vidal JL (2005) Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables. *Analytical Chemistry* 77: 4640-4648
- Ghosh R, Xalxo R and Ghosh M (2013) Estimation of heavy metal in vegetables from different market sites of tribal based Ranchi city through ICP-OES and to assess health risk. *Current World Environment* 8: 435
- Gilbert-Lopez B, Garcia-Reyes JF, Mezcuca M, Molina-Diaz A and Fernandez-Alba AR (2007) Determination of Postharvest Fungicides in Fruit Juices by Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10548-10556
- Giuliani A, Cerretani L, Cichelli A (2011) Chlorophylls in Olive and in Olive Oil: Chemistry and Occurrences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51: 678–690
- González Rodríguez MJ, Garrido Frenich A, Arrebola FJ and Martínez Vidal JL (2002) Evaluation of low-pressure gas chromatography linked to ion-trap tandem mass spectrometry for the fast trace analysis of multiclass pesticide residues. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 12 (16): 1216-1224
- Goullé JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, Bouige D and Lacroix C (2005) Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. *Forensic science international* 153: 39-44
- Grimalt S, Pozo OJ, Sancho JV and Hernandez F (2007) Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Analytical Chemistry* 79: 2833-2844
- Gukowsky JC, Xie T, Gao S, Qu Y and He L (2018) Rapid identification of artificial and natural food colorants with surface enhanced Raman spectroscopy. *Food Control* 92: 267-275
- Gutiérrez-Valencia TM and de Llasera MPG (2017) On-line MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues. *Food Chemistry* 223: 82–88
- Hada M, Takino M, Yamagami T, Daishima S and Yamaguchi K (2000) Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography–mass spectrometry with programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatography A* 874: 81–90
- He H-J and Sun D-W (2015) Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology* 46: 199-210

- Hernandez F, Sancho JV, Ibanez M, Abad E, Portoles T and Mattioli L (2012) Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403: 1251–1264
- Huang Y, Shia T, Luo X, Xiong H, Min F, Chena Y, Niew S and Xie M (2017) Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 275: 255–264
- Jarić I, Višnjić-Jeftić Ž, Cvijanović G, Gačić Z, Jovanović L, Skorić S and Lenhardt M (2011) Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal* 98: 77–81
- Jiao L, Guo Y, Chen J, Zhao X, Dong D (2019) Detecting volatile compounds in food by open-path Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Research International* 119: 968–973
- Jiao L, Dong D, Han P, Zhao X, Du X (2017) Identification of the mango maturity level by the analysis of volatiles based on long optical-path FTIR spectroscopy and a molecular sieve. *Analytical Methods* 9 (16): 2458–2463
- Jie-jun W, Jia C, Song Y and Da-Ming D (2018) Monitoring of grape decay via its volatiles based on Open-path Fourier transform infrared spectroscopy. *Spectroscopy and Spectral Analysis* 38 (7): 2132–213
- Jira W, Ziegenhals K and Speer K (2008) A GC/MS method for the determination of 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and edible oils. *Food Additives and Contaminants* 25: 704–713
- Johnsen AR, Wick LY and Harm H (2005) Principles of microbial PAH degradation in soil. *Environmental Pollution* 133: 71–84
- Jovanov P, Guzsvány V, Lazić S, Franko M, Sakač M, Šarić Lj and Kos J (2015) Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 106–113
- Khan S, Cao Q, Zheng YM, Huang YZ and Zhu YG (2008) Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental pollution* 152: 686–92
- King JW (2000) Supercritical Fluid Chromatography. In: Wilson ID, Adlard ER, Cooke M and Poole CF (Eds.) *Encyclopedia of separation science*. Academic Press, pp 2855–2860
- Kovalczuk T, Jech M, Poustka J and Hajslova J (2006) Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food. *Analytica Chimica Acta* 577: 8–17
- Kumari R, Chaturvedi P, Ansari NG, Murthy RC and Patel DK (2012) Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. *Journal of Food Science* 71: 34–40
- Lachat L and Glauser G (2018) Development and Validation of an ultra-sensitive UHPLC–MS/MS method for neonicotinoid analysis in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 8639–8646
- Leandro CC, Fussell RJ, Keely BJ (2005) Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1085: 207–212

- Li Y-S and Church J (2014) Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 29-48
- López-Alonso M, Miranda M, Castillo C, Hernández J, García-Vaquero M and Benedito JL (2007) Toxic and essential metals in liver, kidney and muscle of pigs at slaughter in Galicia, north-west Spain. *Food Additives and Contaminants* 24: 943-54
- Lucci P, Saurina J and Núñez O (2017) Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *Trends in Analytical Chemistry* 88: 1-24
- Lüthje K, Hyötyläinen T, Rautiainen-Rämä M and Riekkola ML (2005) Pressurised hot water extraction-microporous membrane liquid-liquid extraction coupled on-line with gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticides in grapes. *Analyst* 130: 52-58
- Madej K, Kalenik TK and Piekoszewska W (2018) Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. *Food Chemistry* 269: 527–541
- Marković D i Zvezdanović J (2012) Hromatografija u organskoj analizi. Studentski informativno-izdavački centar, Niš
- Marković DA, Đarmati ŠA, Gržetić IA i Veselinović DS (1996) Fizičko-hemijski osnovi zaštite životne sredine, Izvori zagađivanja, posledice i zaštita. Univerzitet u Beogradu, Beograd
- Martínez Vidal JL, Arrebola Liébanas FJ, González Rodríguez MJ, Garrido Frenich A and Fernández Moreno JL (2006) Validation of a gas chromatography/triple quadrupole mass spectrometry based method for the quantification of pesticides in food commodities. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 365–375
- Martins F, Sentanin M and De Souza D (2019) Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry* 272: 732–750
- McGrath TF, Haughey SA, Patterson J, Fauhl-Hassek C, Donarski J, Alewijn M, van Ruth S and Elliott CT (2018) What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? – Spectroscopy case study. *Trends in Food Science & Technology* 76: 38–55
- McLafferty FW (ed.) (1983) *Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Medina S, Pereira JA, Silva P, Perestrello R, Camara JS (2019) Food fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food Chemistry* 278: 144–162
- Mezcua M, Malato O, Garcia-Reyes JF, Molina-Diaz A and Fernandez-Alba AR (2009) Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 81: 913-929
- Monbaliu S, Van Poucke C, Van Peteghem C, Van Poucke K, Heungens K and De Saeger S (2009) Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem

-
- mass spectrometry method for sweet pepper analysis, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (1): 3-11
- Monna L, Omori T and Kodama T (1993) Microbial degradation of dibenzofuran, fluorine, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 285-289
- Nácher-Mestre J, Serrano R, Portolés T, Berntssen MHG, Pérez-Sánchez J and Hernández F (2014) Screening of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in feeds and fish tissues by gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionization. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 62: 2165–2174
- Nikolić N, Mitrović J, Karabegović I, Savić S, Petrović S, Lazić M and Stojanović GA (2019) Comparison between wheat and different kinds of corn flour based on minerals, free phenolic acid composition and antioxidant activity. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 11(4): 341-349
- Noda I (2015) Recent developments in two-dimensional (2D) correlation spectroscopy. *Chinese Chemical Letters* 26 (2): 167-172
- Olesik JW (1996) Peer reviewed: Fundamental research in ICP-OES and ICPMS. *Analytical Chemistry* 68: 469A-74
- Olesik JW (1991) Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS. *Analytical Chemistry* 63: 12A-21A
- Osborne B (2006) Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. In: Meyers R. (Ed) *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. John Wiley & Sons, Ltd
- Pérez-Ortega P, Lara-Ortega FJ, Gilbert-López B, Moreno-González D, García-Reyes JF and Molina-Díaz A (2017) Screening of over 600 pesticides, veterinary drugs, food-packaging contaminants, mycotoxins, and other chemicals in food by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS). *Food Analytical Methods* 10: 1216–1244
- Peromingo B, Rodríguez M, Núñez F, Silva A and Rodríguez A (2018) Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry* 263: 275–282
- Petrović S, Savić S and Petronijević Ž (2016) Macro- and microelement analysis in milk samples by inductively coupled plasma – optical emission spectrometry. *Acta Periodica Technologica* 47: 51-62
- Petrović S, Savić S, Dimitrijević M and Petronijević Ž (2015) Determination of macro and microelements in chamomile teas (*Matricaria chamomilla* L.). *Advanced technologies* 4: 37-42
- Pico Y, la Farre M, Tokman N and Barcelo D (2008) Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the quantification of amitraz and identification of its degradation products in fruits. *Journal of Chromatography A* 1203: 36-46
- Pico Y, la Farre M, Soler C, Barcelo D (2007) Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Imazalil as a case study of quantification. *Journal of Chromatography A* 1176: 123-134
-

- Porep J, Kammerer D and Carle R (2015) On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology* 46: 211-230
- Portoles T, Mol JGJ, Sancho JV and Hernández F (2014) Use of electron ionization and atmospheric pressure chemical ionization in gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for screening of organic pollutants in waters. *Journal of Chromatography A* 1339: 145-153
- Portoles T, Ibanez M, Sancho JV, Lopez FJ and Hernandez F (2009) Combined Use of GC-TOF MS and UHPLC-(Q)TOF MS To Investigate the Presence of Nontarget Pollutants and Their Metabolites in a Case of Honeybee Poisoning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 4079-4090
- Qin J, Kim MS, Chao K, Schmidt WF and Cho BK (2017a) Line-scan Raman imaging and spectroscopy platform for surface and subsurface evaluation of food safety and quality. *Journal of Food Engineering* 198: 17-27
- Qin J, Kim MS, Chao K, Schmidt WF, Dhakal S, Cho B-K, Peng Y and Huang M (2017b) Subsurface inspection of food safety and quality using line-scan spatially offset Raman spectroscopy technique. *Food Control* 75: 246-254
- Raskin I, Kumar PN, Dushenkov S and Salt DE (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in biotechnology* 5: 285-90
- Rizzetti TM, Kemmerich M, Martins ML, Prestes OD, Adaime MB and Zanella (2016) Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* 196: 25-33
- Roca M, Gandul-Rojas B, Guerrero LG and Minguez-Mosquera MI (2003) Pigments parameters determining Spanish virgin olive oil authenticity: stability during storage. *Journal American Oil Chemists's Society* 80: 1237-1240
- Santini A, Ferracane R, Somma MC, Aragon A and Ritieni A (2009) Multitoxin extraction and detection of thricotecenes in cereals: an improved LC-MS/MS approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1145-1153
- Savić S, Petrović S, Stamenković J and Petronijević Ž (2015) The presence of minerals in clear orange juices. *Advanced technologies* 4: 71-78
- Savić S, Petrović S, Petronijević M, Cvetanović A and Petronijević Ž (2019) Determination of the mineral content of spices by ICP-OES. *Advanced technologies* 8(1): 27-32
- Sess-Tchotch D-A, Kedjebo KBD, Faulet BM, Fontana-Tachon A, Alter P, Durand N, Grabulos J, Montet D and Guehi TS (2018) Analytical method validation and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cocoa butter using HPLC-FLD. *Food Analytical Methods* 11: 3138-3146
- Shi Y, Wu H, Wang C, Guo X, Du J and Du L (2016) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD. *Food Chemistry* 199: 75-8
- Shiea C, Huang Y-L, Liu D-L, Chou C-C, Chou J-H, Chen P-Y, Shiea J and Huang M (2015) Rapid screening of residual pesticides on fruits and vegetables using thermal desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 29: 163-170

- Silva M, Viegas O, Melo A, Finteiro D, Pinho O and Ferreira IMPLVO (2018) Fast and reliable extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from grilled and smoked muscle foods. *Food Analytical Methods* 11: 3495–3504
- Singh R, Yadav A, Chopra A, Christopher J and Kapur GS (2019) Comparison of five different HPLC columns with different particle sizes, lengths and make for the optimization of seven polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) analysis. *SN Applied Sciences* 1: 313-325
- Sivakesava S and Irudayaraj J (2002) Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 85: 487–493
- Soler C, James KJ, Pico Y (2007) Capabilities of different liquid chromatography tandem mass spectrometry systems in determining pesticide residues in food. Application to estimate their daily intake. *Journal of Chromatography A* 1157: 73-84
- Štajnbaher D and Zupančič-Kralj L (2003) Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1015: 185-198
- Stojiljković M, Petrović S, Stojiljković S, Savić S and Todorović B (2018) Macro and micro element composition of Osage orange *Maclura pomifera* L. (Moraceae). *Journal of Elementology* 23; 1399-1411
- Sulyok M, Krska R and Schuhmacher (2007) A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1505-1523
- Thurman EM, Ferrer I, Zweigenbaum JA, García-Reyes JF, Woodman M and Fernández-Alba AR (2005) Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1082: 71-80
- Todorović B, Stojiljković S, Stojiljković, Petrović, Takić Lj and Stojiljković M (2017) Removal of As³⁺ cations from water by activated charcoal, bentonite and zeolite in a batch system at different pH. *Journal of Elementology* 22: 713-723
- Varlet V, Serot T, Monteau F, Le Bizec B and Prost C (2007) Determination of PAH profiles by GC–MS/MS in salmon processed by four cold-smoking techniques. *Food Additives and Contaminants* 24: 744-757
- Yoo YC, Lee SK, Yang JY, In SW, Kim KW, Chung KH, Chung MG and Choung SY (2002) Organ distribution of heavy metals in autopsy material from normal Korean. *Journal of Health Science* 48: 186-94
- You Z, Zhuo L, Yang X, Hong H, Liu Z, Gong Z and Cheng F (2015) Food research applications of two-dimensional correlation spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* 50 (10): 840-85
- Zelinkova Z and Wenzl T (2015) The occurrence of 16 EPA PAHs in food – A review. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35: 248–284
- Zhang B, Ye S, Xiao G and Dong D (2015) Identification of beef spoilage via the analysis of volatiles using long optical-path Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Methods* 7 (14): 5891-5897

Establishment of the presence of biological and chemical contaminants in food

**Dragan Cvetković, Sanja Petrović, Jelena Zvezdanović,
Saša Savić, Milorad Cakić**

The importance and necessity of food quality control can be observed from two aspects at least – the safety and reliability of the certain foodstuff consumption as well as the rising of consumers' confidence in the producers. Bearing this in mind, it is not necessary to emphasize the importance of continuous improvement of existing and development of new spectroscopic and chromatographic techniques dealing with food quality control. In order to summarize modern-day achievements, the aim of this chapter was to review the newest technical and technological modifications of existing spectroscopic and chromatographic techniques just used in food testing and control. As the most commonly exploited techniques – infrared, Raman, fluorescence and inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy are selected from a rich spectroscopic arsenal, as well as gas and liquid chromatography coupled with mass spectrometry from the group of chromatographic techniques.

Key words: Food, Bio-active substances, Analysis methods, Spectroscopic methods, Chromatographic methods