

PREGLEDNI RAD / REVIEW

Analitičke metode u forenzici hrane

Analytical methods in food forensics

Ana Butorac¹, Mirela Marić², Marija Badanjak Sabolović¹, Mirjana Hruškar¹,
Suzana Rimac Brnčić¹, Višnja Bačun Družina^{1*}

¹ Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

² Poliklinika Aviva, Nemetova 2, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

U Europskoj uniji propisane kontrole za sigurnost hrane prema zakonskim aktima određuju provjeru hrane prije stavljanja na tržište. Tijekom proteklog desetljeća provjera kakvoće, autohtonosti i sljedivosti hrane poboljšana je ubrzanim razvojem osjetljivih, robusnih, učinkovitih i cjenovno prihvatljivih analitičkih metoda. Ovaj rad opisuje najučinkovitije analitičke metode za forenziku hrane i prikazuje njihovu primjenu u određivanju: (1) kvalitativnih i kvantitativnih sastojaka hrane, (2) sigurnosti hrane obzirom na patogene mikroorganizme, nutritivne alergene, ostatke pesticida i toksina, (3) sljedivosti sukladno zemljopisnom i botaničkom podrijetlu te utjecaju tehnološke obrade i skladištenja. Obzirom na način ispitivanja, opisane analitičke metode podijeljene su u četiri skupine: biokemijske, molekularno-genetske, spektroskopske i spektrometrijske te separacijske metode.

Cljučne riječi: forenzika hrane, analitičke metode, autohtonost

Summary

The European Union food safety legislation prescribes controls in order to implement the testing of food before putting it on the market. Over the past decade checking quality, originality and the traceability of food has improved the rapid development of sensitive, robust, efficient and affordable analytical methods. This paper describes the most effective analytical methods for forensic food and shows their use in determining: (i) qualitative and quantitative food ingredients, (ii) food safety due to pathogens, allergens, nutritional, residues of pesticides and toxins, (iii) traceability according to geographical and botanical origin and the impact of technological processing and storage. Given the way tests are described analytical methods are divided into four groups as following: biochemical, molecular-genetic, spectroscopic and spectrometric, and separation methods.

Keywords: food forensics, analytical methods, autochthonous, traceability

Uvod

Forenzika hrane je disciplina koja se bavi analizom hrane u svrhu određivanja njene kakvoće, izvornosti i autentičnosti. Koriste se metode za otkrivanje udjela sastojaka transgenog podrijetla, bioaktivnih supstancija, aditiva, kontaminacija patogenim mikroorganizmima, mikotoksinima podrijetlom iz plijesni, enterotoksinima iz bakterija, toksičnim tvarima iz okoliša, kao što su dioksini, poliklorirani bifenili, policiklički aromatski ugljikovodici, teški metali, radioaktivni elementi i pesticidi. Nadalje, za otkrivanje toksičnih spojeva nastalih obradom hrane pri visokim temperaturama poput akrilamida, kloropropanola, hetrocikličkih amida, policikličkih aromatskih ugljikovodika i ostatka sredstava za čišćenje te ostataka štetnih tvari nakon tretiranja životinja u intenzivnom uzgoju s antibioticima, hormonskim pripravcima, antiparazitskim lijekovima i sredstvima za smirenje. U Republici Hrvatskoj uz propisane zahtjeve kakvoće, hrana pripremljena za tržište mora udovoljavati zahtjevima zdravstvene ispravnosti i označavanja hrane prema Zakonu o hrani (NN br. 46/07, 55/11), Zakonu o zdravstvenoj ispravnosti i zdravstvenom nadzoru nad namirnicama i predmetima opće uporabe (NN br. 1/97), Zakonu o oznakama izvornosti, oznakama zemljopisnog podrijetla i oznakama tradicionalnog ugleda poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda

(NN br. 50/12). Namirnice koje se proizvode ili uvoze prije stavljanja u promet na domaćem tržištu moraju zadovoljavati određene uvjete, a da bi se provjerili određeni zadani standardi, provode se kontrole pomoću odgovarajućih analitičkih postupaka. Odabir izabrane analitičke metode uvjetovan je s više čimbenika kao što su: točnost, preciznost, ponovljivost, granica detekcije i kvantifikacije, radno područje, selektivnost i priprava uzorka. U ovom preglednom radu opisane su najčešće korištene analitičke metode za forenziku hrane, a podijeljene su u četiri skupine: (1) biokemijske, (2) molekularno-genetske, (3) spektroskopske i spektrometrijske te (4) separacijske metode.

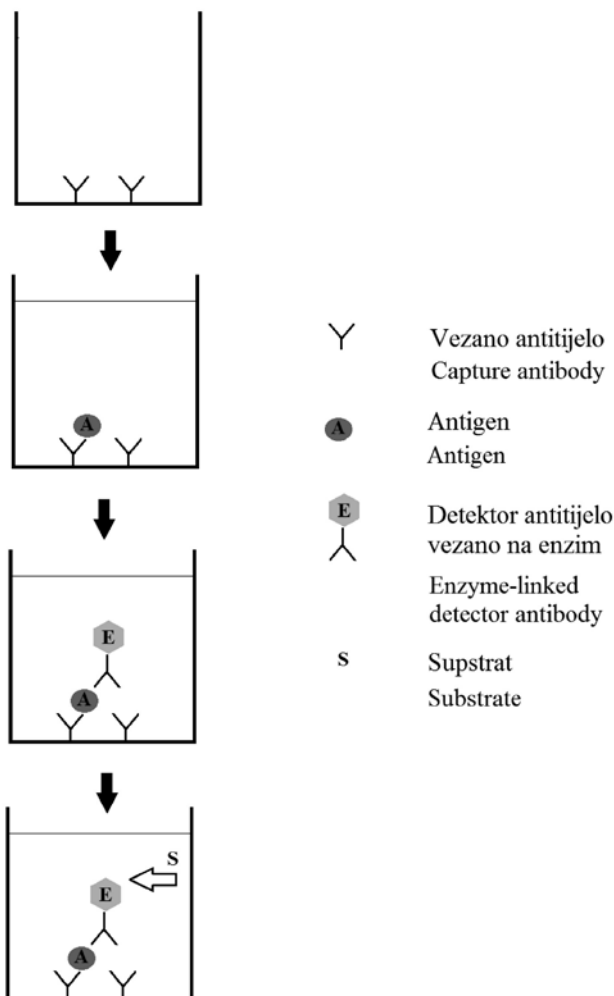
1. Biokemijske metode

U forenzici hrane često se koriste biokemijske metode koje detektiraju imunoenzimske reakcije pri traženju supstancije. Imunološki testovi se zasnivaju na svojstvu antitijela za specifično vezanje s antigenima ili haptenuima. Ovi testovi se učestalo koriste zbog svoje specifičnosti, osjetljivosti, relativno jednostavnog izvođenja i niske cijene u odnosu na druge analitičke tehnike na ovom području.

*Corresponding author: visnjabd@pbf.hr

1.1. Imunoenzimski test

Imunoenzimskim testom ELISA (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se određuje prisutnost i količina antigena. Reakcija ELISA se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. Ovom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka. Postoje više vrste tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: indirektna, sendvič (slika 1), konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča. Primjena testa ELISA je vrlo raširena u forenzici hrane i koristi se pri određivanju alergena u hrani kao što je mlijeko, kikiriki, lješnjak i jaja te kontaminacija mikroorganizmima, pesticidima i antibioticima (Chen i sur., 2012). Pomes i suradnici (2003) određivali su udio alergena kikirikija Ara h 1 metodom ELISA u 83 različita prehrambena proizvoda. Udio alergena Ara h 1 kretao se u rasponu od 0.1 µg/g do 500 µg/g. Utvrdili su da se ova metoda može koristiti za praćenje eventualne kontaminacije alergenom Ara h 1 tijekom procesa proizvodnje te za određivanje praga (0.2 mg) pri kojem dolazi do senzibilizacije u osoba koje su alergične na kikiriki. Peng i suradnici (2013) poboljšanjem metode snizili su granicu detekcije alergena Ara h 1 na 0.34 ng/mL.



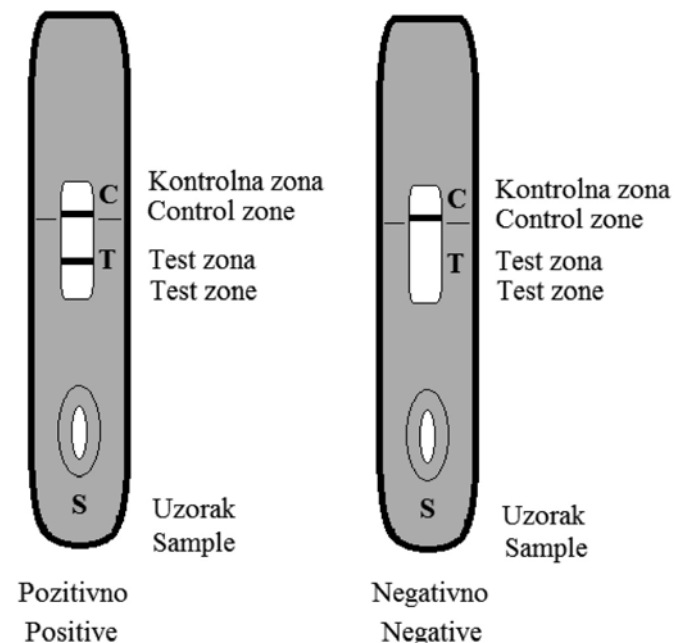
Slika 1. Imunoenzimski test ELISA (prilagođeno prema Yeung, 2006).

Figure 1. A sandwich ELISA (adapted from Yeung, 2006).

Thornton i suradnici (2010) su metodom ELISA detektirali prisutnost plijesni *Geotrichum candidum* u rajčicama i sokovima od rajčica. Plijesan *G. candidum* izaziva kiselo kvašenje rajčica i sokova od rajčice, a često je kontaminant kojeg možemo naći u opremi za tehnološku obradu. Xu i suradnici (2012) su razvili metodu ELISA za praćenje organofosfornih pesticida u povrću kao što su poriluk, grah i kupus. Pozitivne uzorke su podvrgnuli daljnjim analizama pomoću metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (*engl.* High-Performance Liquid Chromatography and tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS), koje će biti opisane kasnije u ovom radu, i utvrdili su da se kombinacijom ovih dviju metoda mogu detektirati organofosforni pesticidi (paration, paration-metil, forat, fosalon) s granicom kvantifikacije ispod 20 µg po kg ispitivanog uzorka.

1.2. Imunokromatografski test

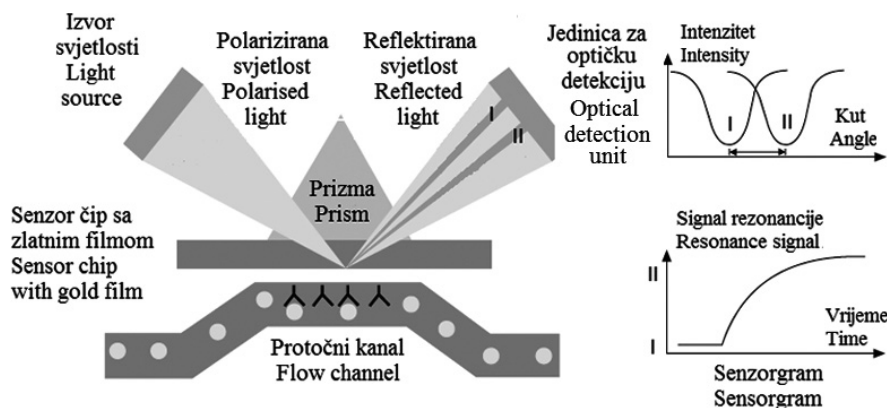
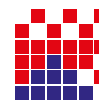
Ispitivanje imunokromatografskim testom (*engl.* Lateral Flow Immunochromatographic Test) je brzo i jeftino te se može provoditi pomoću jednostavnog uređaja bez uporabe skupe i specijalizirane opreme. Ovaj test temelji se na vezanju antigena iz tekućeg uzorka s antitijelima adsorbiranim na nitroceluloznu membranu u obliku crte (test zona). U blizini test zone na istoj membrani adsorbirana su i kontrolna protutijela koja omogućuju nastanak druge kontrolne crte (kontrolna zona). Antitijela prema analitu su konjugirana s česticama koje omogućavaju njihovu vidljivost. U slučaju pozitivnog testa vidljive su obje crte, a kod negativnog samo kontrolna (slika 2).



Slika 2. Imunokromatografski test (prilagođeno prema Van Herwijnen, 2006).

Figure 2. Lateral flow immunochromatographic test (adapted from Van Herwijnen, 2006).

Ova se metoda učestalo primjenjuje za utvrđivanje prisutnosti alergena u hrani (Mendez i sur., 2005). Zheng i suradnici (2012) razvili su ovaj test za određivanje parvalbumi-



Slika 3. Princip SPR detekcije (prilagođeno prema Situ i sur., 2010).

Figure 3. The principle of SPR detection (adapted from Situ et al., 2010).

na (Pvalb), najznačajnijeg ribljeg alergena. Utvrđene granice za kvalitativnu i kvantitativnu detekciju su 5 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 0,046 $\mu\text{g/mL}$, a vrijeme detekcije je 20 minuta. Pomoću ovog testa može se također utvrditi je li hrana proizvedena od genetički preinačenih kultivara (Ahmed, 2002) te sadrži li neke patogene kao što je na primjer *Listeria monocytogenes* (Blažkova i sur., 2009) ili mikotoksine (Liu i sur., 2012).

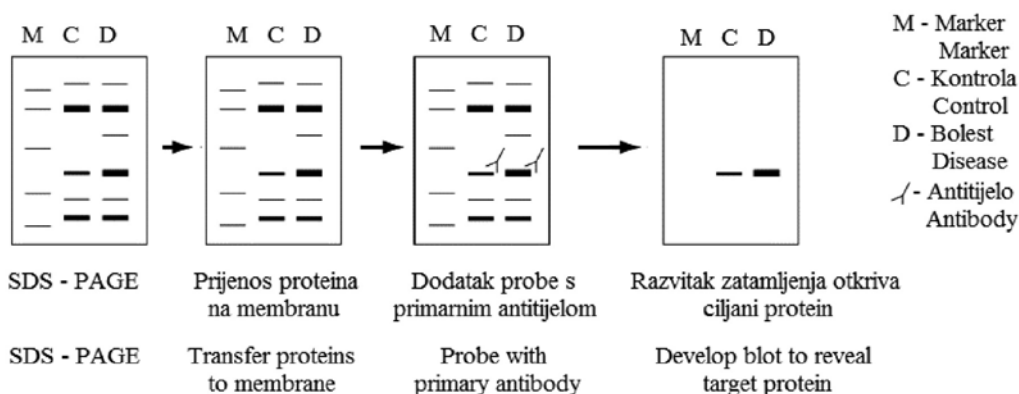
1.3. Biosenzori

Biosenzori su analitički uređaji koji se sastoje od osjetljivog biološkog elementa, bioreceptora, sonde ili elementa za detekciju i uređaja za čitanje elektronskih signala. Pri otkrivanju željenog analita (biološkog ili kemijskog) dolazi do nastanka kompleksa s bioreceptorom po principu antitijelo-antigen, enzim-supstrat odnosno receptor-ligand. Bioreceptor može biti antitijelo, enzim, mikroorganizam, tkivo, organel, stanični receptor, nukleinska kiselina i sl. Za analizu prehrambenih proizvoda često se koriste optički biosenzori SPR (*engl.* Surface Plasmon Resonance - SPR) koji imaju sposobnost detekcije vezanja biomolekula u stvarnom vremenu (nekoliko sekundi ili minuta), a na temelju promjene otklona polariziranog svjetla zbog povezivanja analita i bioreceptora (slika 3). Biosenzori se učestalo koriste u prehrambenoj industriji za detekciju patogenih mikroorganizama i njihovih toksina (Baeumner, 2003; Pohanka i sur., 2007). Upotrebljavaju se za utvrđivanje prisutnosti antibiotika i sulfonamida u mlijeku (Gaudin i sur., 2007) te nutritivnih alergena (Yman i sur., 2006). Mogu se koristiti i za utvrđivanje prisutnosti mikroorganizama u hrani kao na primjer *E. coli* O157:H7 u mlijeku i soku jabuke u vrlo kratkom

vremenu, otprilike za 30 minuta, s kvantitativnom točnošću detekcije od 10^2 do 10^3 bakterija po mL uzorka (Oh i sur., 2002; Wasva i sur., 2007). Ovog proljeća istraživači na Sveučilištu Illinois, SAD, su ugradili biosenzor u iPhone koji će moći detektirati viruse, bakterije, toksine, proteine, pa čak i alergene u hrani (<http://mobihealthnews.com>).

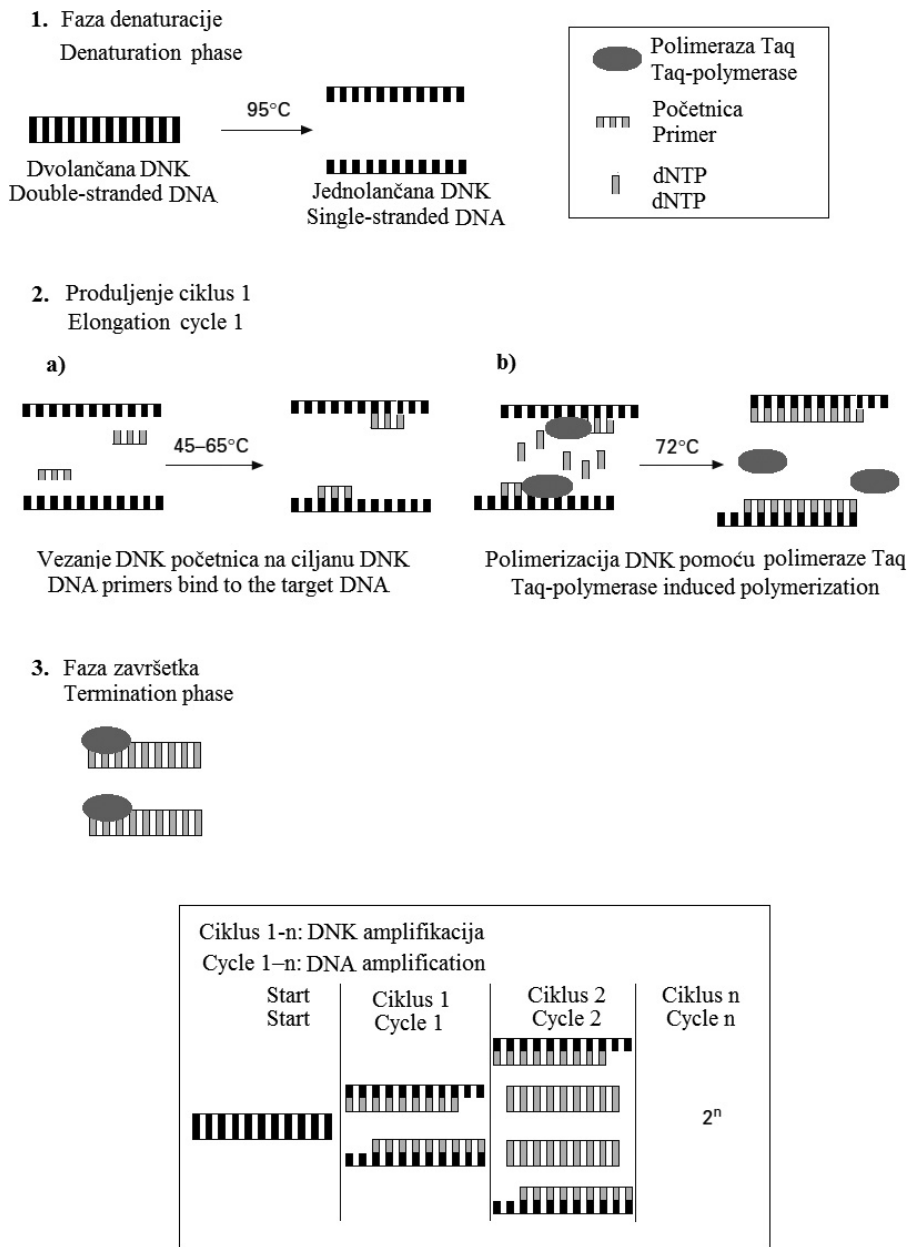
1.4. Analiza Western blot

Analitička analiza Western blot se koristi za otkrivanje specifičnog proteina iz ispitivanog uzorka. Proteini iz uzorka se razdvoje natrijev dodecilsulfat-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) na osnovi molekulske mase i prenesu na nitroceluloznu, sintetsku, najlonsku ili PVDF membranu te se provodi njeno izlaganje specifičnom primarnom antitijelu. Na vezano primarno antitijelo specifično se veže obilježeno sekundarno antitijelo, što se očitava kao emisija svjetla ili taložna boja na mjestu specifičnog vezanja tj. tamna linija (slika 4). Budući da se za detekciju specifičnih proteina na membrani koriste antitijela, ova se metoda također naziva imuno-analiza proteina (*engl.* protein immunoblot). Analiza Western blot je obavezna metoda pri otkrivanju alergena u hrani vezanjem imunoglobulina E (IgE) na alergene te pri utvrđivanju IgE nakon kombinirane reakcije između alergena u hrani i alergena iz zraka kao što su pelud ili spore plijesni (Bolhaar i sur., 2004; Comstock i sur., 2004; Reindl i sur., 2002; Wensing i sur., 2003; Chung i Champagne, 2011; Satoh i sur., 2011)



Slika 4. Shematski prikaz analize Western

Figure 4. Schematic of Western blot



Slika 5. Shematski prikaz umnažanja dijela DNK pomoću lančane reakcije polimeraze (prilagođeno prema Holzhauser i sur., 2006).

Figure 5. Schematic diagram of the multiplication of DNA fragment using polymerase chain reaction (adapted from Holzhauser et al., 2006).

2. Molekularno-genetske metode

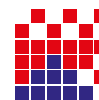
Molekularno-genetske metode temelje se na umnažanju i analizi molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Za analizu DNK uglavnom se koriste lančana reakcija polimeraze (*engl.* Polymerase Chain Reaction, PCR) i njene brojne modifikacije te elektroforeza u umreženom polimeru agaroznog ili poliakrilamidnog gela.

2.1. Metoda lančane reakcije polimeraze i modifikacije

Danas je PCR brza, jednostavna i specifična metoda u kojoj se za umnažanje specifičnog dijela molekule DNK koriste različiti termostabilni enzimi polimeraze DNK kao što je na primjer Taq polimeraza (slika 5). Za reakciju PCR potreb-

no je pripremiti smjesu koja sadrži: DNK koji se želi ispitati, termostabilnu polimerazu, početnice te istu koncentraciju sva četiri deoksinukleozid trifosfata (*engl.* Deoxyribonucleoside Triphosphates, dNTP). Početnice su kratki i specifični oligonukleotidi koji imaju sekvencije komplementarne dijelu DNK koji želimo umnožiti. Svaki ciklus PCR sastoji se od tri faze: denaturacija, elongacija i terminacija. Nakon provođenja PCR može se dobiti nekoliko milijardi identičnih kopija određenog ciljnog fragmenta molekule DNK (slika 5).

Uporabom modificiranih tehnika PCR može se kvantitativno odrediti udio odabranih gena iz različitih životinjskih i biljnih vrsta u namirnicama ili količina genetički modificiranih sastojaka. Za takva kvantitativna mjerenja koriste se usporedni PCR (*engl.* Competitive PCR) i qPCR u realnom vremenu (*engl.* Quantitative Real-Time PCR, qPCR). Usporedni PCR se

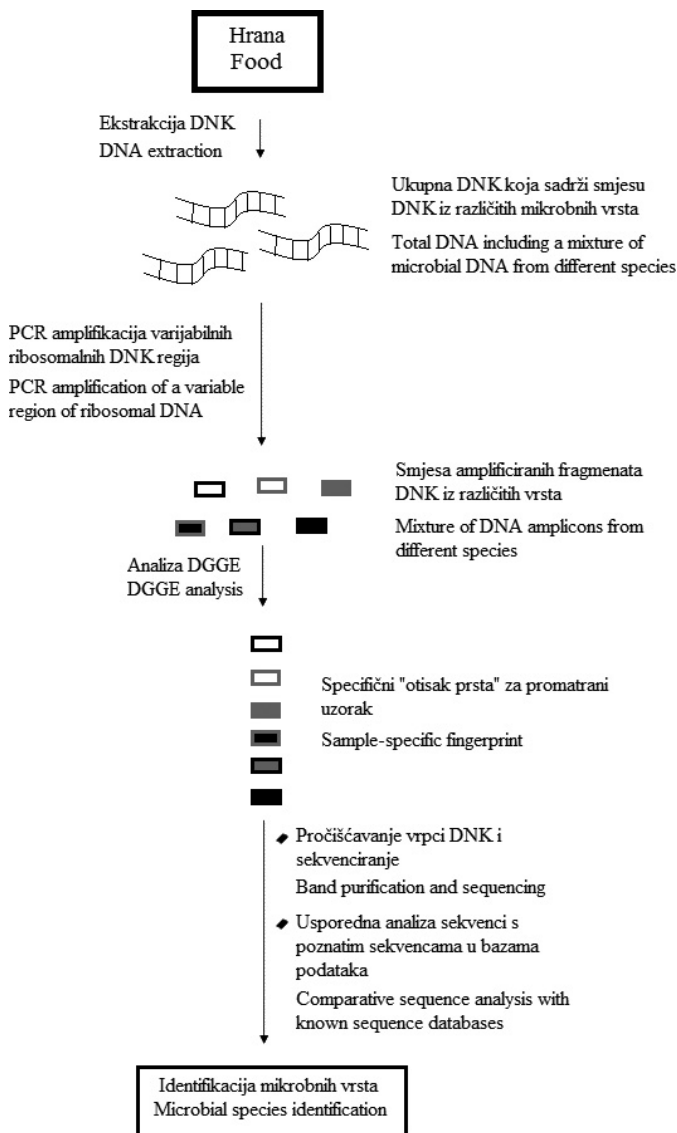


bazira na umnažanju internog standarda u isto vrijeme s umnažanjem ciljane molekule DNK. Usporedbom količine produkata reakcije PCR standarda i ciljane DNK direktno se očitava udio ciljanog sastojka u uzorku namirnice. Korištenjem fluorescencijno obilježenih početnica i kapilarnog sekvenatora DNK moguće je u kratkom vremenu odrediti i male varijacije između dvije vrlo slične vrste te udio miješanja te dvije vrste u namirnici. U qPCR analizama se koriste fluorescencijne boje koje omogućavaju mjerenje produkta reakcije PCR nakon svakog amplifikacijskog ciklusa. U varijanci qPCR poznatoj pod nazivom TaqMan fluorescentna boja (*engl.* Report molecule, R) je vezana na oligonukleotidnu sondu na koju je vezan i prigušivač (*engl.* Quencher, Q). Tijekom reakcije qPCR Taq polimeraza razgrađuje oligonukleotidnu sondu te dolazi do razdvajanja boje R i prigušivača Q. Razdvajanjem boje R od prigušivača Q, boja R počinje fluorescirati. Količina fluorescencije je proporcionalna početnoj koncentraciji DNK. U isto vrijeme može se amplificirati i DNK koja služi kao interni standard, koji je obilježen drugom fluorescencijom, a što zbirno poboljšava točnost kvantifikacije. Navedenim metodama dokazana je autentičnost basmati riže (Ganopoulos i sur., 2011a), utvrđena je sorta trešnje određenog područja (Ganopoulos i sur., 2011b), detektirani su alergeni iz badema (Costa i sur., 2012), utvrđena je autentičnost divljih u usporedbi s kultiviranim sortama borovnica (Jaakola i sur., 2010), utvrđeno je i patvorenje proizvoda od grahorica (Ganopoulos i sur., 2012), a i identificirane su vrste mesa u morskim plodovima (Pascoal i sur., 2012), utvrđena je vrsta mesa u kuhanim prehrambenim proizvodima (Aslan i sur., 2008) te kvantitativno i kvantitativno su određeni alergeni soje u mesnim kobasicama (Siegel i sur., 2012).

2.2. Metode temeljene na fizikalnim svojstvima slijeda DNK

Ove metode se koriste za određivanje genotipa vrste prisutne u namirnici, odnosno kako bi se potvrdila autentičnost hrane. Najčešće se koriste tri pristupa: određivanje pojedinačnog nukleotidnog polimorfizama (*engl.* Single-Nucleotide Polymorphism, SNP), zatim korištenje metode polimorfizam dužine restriktivnih fragmenata (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) i određivanje varijabilnog broja uzastopnih ponavljajućih sljedova (*engl.* Variable Number Tandem Repeats, VNTRs).

Pojedinačni nukleotidni polimorfizam je varijacija nukleotida u skvenciji DNK, a svojstven je za pojedine pripadnike određene prokariotske i eukariotske biološke vrste te za različite sojeve ili sorte unutar iste vrste organizma. Ispitivanje pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama je točna, brza i isplativa metoda za određivanje sljedivosti željenog sastojaka u prehrambenom proizvodu. Utvrđivanje pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama najčešće se provodi metodama skvencioniranja jednog dijela molekule DNK iz genoma određenog organizma (Rounsley i Last, 2010), a također i drugim molekularnim metodama analize genoma (Kuipers, 1999) kao i analizom proteoma (Primrose i sur., 2010; Butorac i sur., 2013). Analizom SNP određena je sljedivost i autentičnost maslinovog ulja (Consolandi i sur., 2008), autentičnost voća u jogurtu (Ortola-Vidal i sur., 2007) te podrijetlo goveđeg i svinjskog mesa (Negrini i sur., 2008; Ramos i sur., 2011).



Slika 6. Shematski prikaz gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (prilagođeno prema Ercolini, 2004)

Figure 6. Schematic diagram of the denaturing gradient gel electrophoresis (adapted from Ercolini, 2004).

Često korištenom metodom RFLP, za analizu genoma, najprije se umnaža dio DNK reakcijom PCR, a zatim se dobiveni produkti PCR reakcije cijepaju s restriktivnim endonukleazama. Budući da restriktivske endonukleaze specifično cijepaju DNK, prisutnost polimorfizama omogućava ili omogućava cijepanje što se dalje koristi za identifikaciju. U svrhu forenzike hrane najčešće se umnaža gen koji kodira za citokrom b oksidazu. Gen koji kodira za citokrom b oksidazu se nalazi na mitohondrijskoj DNK koja je manje podložna degradaciji tijekom procesa obrade hrane te se nalazi u više kopija u stanicama što ga čini vrlo pogodnim za analize. Ovom metodom je određena autentičnost mesa divljači, ribe i morskih plodova (Fajardo i sur., 2007; Lee i sur., 2009; Pascoal i sur., 2012), prisutnost alergena iz rakova (Brzezinski, 2005) te udio voća u džemovima (Arleo i sur., 2012).

2.3. Elektroforske metode

Metodom gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (*engl.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) razdvajaju se molekule DNK iste veličine, ali različitih nukleotidnih sekvencija. Ova metoda se u forenzici hrane koristi za analizu mikrobnih zajednica koje se nalaze u hrani. Metoda se bazira na reakciji PCR kojom se umnažaju molekule DNK iz ribosomalnih gena 16S ili 18S te se zatim umnožene molekule DNK razdvajaju u akrilamidnom gelu koji je sastavljen od niskog do visokog denaturirajućeg gradijenta uree (slika 6) ili od temperaturnog gradijenta pri konstantnoj koncentraciji uree. Na početku gel elektroforeze ispitivane molekule DNK se razdvajaju na temelju njihove veličine, a potom ovisno o nukleotidnom sastavu. Kada se molekule DNK nađu u za njih denaturirajućem području dolazi do topljenja dvostrukih zavojnica i nastanu jednolančane molekule. Nastale jednolančane molekule DNK usporavaju daljnje putovanje kroz akrilamidni gel. Posljedično molekule s različitim nukleotidnim sastavom nalaze se na različitoj udaljenosti obzirom na različiti denaturirajući gradijent. Metodom DGGE su opisane patogene bakterije u 73 uzorka hrane (Cocolini i sur., 2002), identifikacija mikroorganizama izoliranih iz prehrambenih proizvoda (Ercolini, 2004) te bakterijski kontaminanti tijekom proizvodnje želatine (De Clerck i sur., 2004).

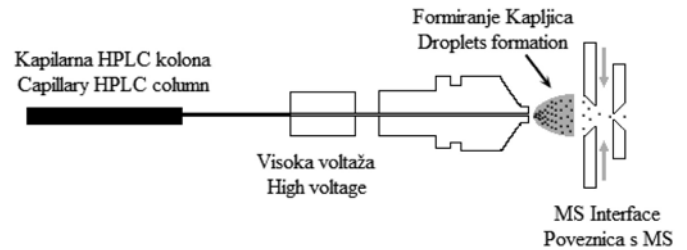
3. Spektroskopske i spektrometrijske metode

Spektroskopijom se proučava interakcija elektromagnetskog zračenja i analiziranog uzorka te se dobivaju informacije o građi i sastavu uzorka. Najčešće se koristi u analitičke svrhe i podijeljena je prema spektralnom području te su ovom radu navedene: nuklearna magnetska rezonancija te infracrvena, ultrazvučna i fluorescentna spektroskopija.

Uz spektroskopske metode koje se bave valovima, postoje i spektrometrijske metode kao npr. spektrometrija masa koja analizira čestice (nabijene ione), točnije omjer mase i naboja mjerenoj analiti.

3.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (*engl.* Mass Spectrometry, MS) je analitička metoda koja razdvaja ione u plinskoj fazi pod visokim vakuumom uslijed utjecaja električnog ili magnetskog polja, a razdvojeni ioni se detektiraju prema omjeru mase i naboja m/z . Na temelju snimljenog spektra moguće je odrediti sastav ispitivanog uzorka. Spektar masa predstavlja skup svih ionizabilnih masa pojedinih sastojaka u višekomponentnom uzorku. Najčešće tehnike spektrometrije masa su ionizacija elektroaspršivanjem (*engl.* Electrospray Ionization, ESI) i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl.* Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). Metode bazirane na spektrometriji masa često se koriste u kombinaciji s kromatografskim instrumentima te služe kao snažno oruđe u forenzici hrane. Ovom metodom mogu se razdvajati i analizirati stotine kompleksnih spojeva u vrlo kratkom vremenu te se dobiti podaci o spojevima prisutnim u namirnici. Najčešće separacijske tehnike koje se koriste u kombinaciji sa spektrometrijom masa su tekućinska (*engl.* Liquid Chromatography, LC) i plinska kromatografija (*engl.* Gas Chromatography, GC).



Slika 7. Shematski prikaz sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) povezane s ionizacijskom tehnikom spektrometrije masa (MS, prilagođeno prema Loo i Kilby, 2002).

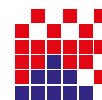
Figure 7. Schematic diagram of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) combined with ionisation technique in mass spectrometry (MS) system (adapted from Loo and Kilby, 2002).

Spektrometrija masa kojom se određuje udio izotopa (*engl.* Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS) je metoda koja može razlučiti kemijski identične spojeve, ali različitog izotopnog sastava. Ovom metodom mogu se odrediti udjeli stabilnih izotopa elemenata $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^1\text{H}/^2\text{H}$ i $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ u uzorku. Udio pojedinih izotopa u hrani ovisi o različitim čimbenicima kao što su npr. zemljopisno ili botaničko porijeklo prehrambenih namirnica. Najpoznatiji instrumenti koji se koriste za IRMS analize su IRMS s kontinuiranim protokom (*engl.* Continuous Flow, CF-IRMS) i IRMS s dva izvora iona (*engl.* Dual Inlet, DI-IRMS, Benson i sur., 2006). DI-IRMS metoda je dugotrajnija, obično zahtijeva veću količinu uzorka, ali je i točnija metoda, a uzorci se pripremaju pojedinačno, dok je CF-IRMS metoda brža i jednostavnija, prilagođena automatskoj pripremi uzorka te se često koristi u kombinaciji s plinskom ili tekućinskom kromatografijom. Metoda IRMS se najčešće koristi u svrhu određivanja zemljopisnog porijekla različitih prehrambenih sirovina i proizvoda kao što su krumpir (Longobardi i sur., 2011), med (Schellenberg i sur., 2010), mliječni (Rossmann, 2001) i mesni proizvodi (Schmidt i sur., 2005; Sentandreu i sur., 2010) ili za provjeru kakvoće povrća, voća, vina, meda, kave i voćnih sokova (Kelly, 2003; Dion i sur. 2008) te utvrđivanja autentičnosti viskija (Meier-Augenstein i sur., 2012).

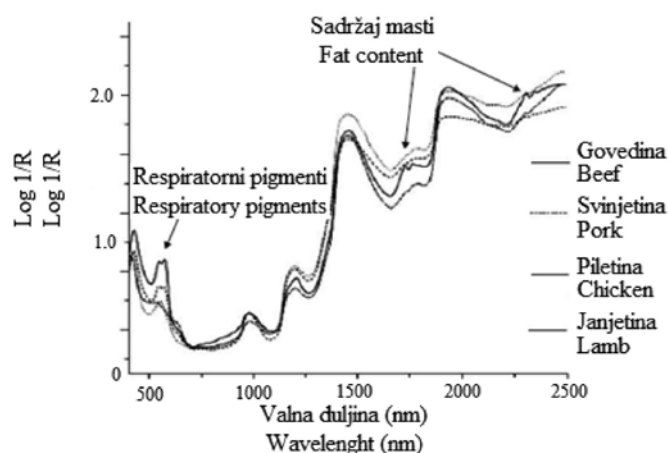
Spektrometrija masa induktivno spregnutom plazmom (*engl.* Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) je brza i vrlo osjetljiva metoda kojom se mogu analizirati tekući i kruti uzorci. Pogodna je za kvantitativno određivanje različitih metala i nemetala u hrani koji se mogu odrediti u iznimno niskim vrijednostima koncentracije od ppq (*engl.* parts-per-quadrillion, 10^{-15}). Princip tehnike ICP-MS je elementna dekompozicija uzorka te ionizacija atoma uz pomoć plazme argona pri visokoj temperaturi, a dobiveni ioni se zatim analiziraju na temelju odnosa mase i naboja. U forenzici hrane ova se metoda koristi kako bi se odredio sastav toksičnih i nutritivnih kationa u hrani te odredilo zemljopisno podrijetlo namirnice (Kelly, 2005; Dion i sur. 2008).

3.2. Nuklearna magnetska rezonancija

Metodom nuklearne magnetske rezonancije (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance, NMR) mjeri se apsorpcija radiozrače-



nja atomske jezgre u jakom magnetskom polju. Pri mjerenju uz NMR najčešće se koriste pobuđene jezgre izotopa vodika i ugljika. U analizi hrane koriste se dva tipa metode NMR: uz nisku rezoluciju (*engl.* Low Resolution NMR, LR-NMR) i uz visoku rezoluciju (*engl.* High Resolution NMR, HR-NMR). Instrumenti za LR-NMR su većinom prenosivi, lako se koriste te su ekonomski prihvatljivi, no zahtijevaju referentne metode za kvantitativna mjerenja i nemaju veliku točnost mjerenja. Metoda HR-NMR je točnija i dobivaju se detaljniji podaci o strukturi uzorka, međutim analize ovom metodom su skuplje od ostalih ovdje navedenih. Analize metodom NMR se koriste u forenzici hrane za određivanje zemljopisnog podrijetla i senzorskih svojstva pojedinih sorta grožđa i vina (Rocfort i sur., 2010), kakvoće piva, maslinovog ulja, kave, zelenog čaja, mliječnih proizvoda, mesa i ribe, ulja, oksidacijskog statusa proizvoda, udjela prirodnog soka u mješavinama (Meurens, 2003; Reuhs i Simsek, 2010), razlikovanje tkiva u namirnicama životinjskog podrijetla te utvrđivanje stupnja zrelosti rajčica (Perez i sur., 2010).



Slika 8. NIR spektri janječeg, govedeg, pilećeg i svinjskog mesa (prilagođeno prema Cozzolino i Murray, 2004).

Figure 8. NIR spectra of lamb, beef, chicken and pork meat (adapted from Cozzolino and Murray, 2004).

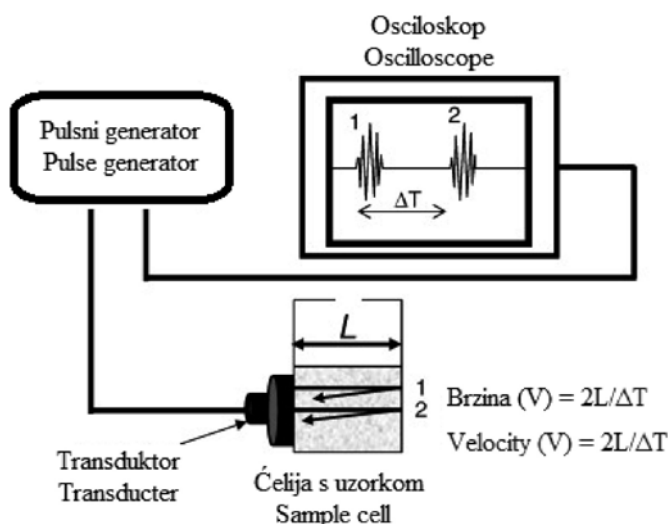
3.3. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (*engl.* Infrared spectroscopy, IR) je metoda kojom se mjeri valna duljina i intenzitet apsorpcije infracrvenog zračenja u ispitivanom uzorku. Ovom se metodom mogu odrediti funkcionalne skupine molekula u namirnici budući da svaka funkcionalna grupa proučavane molekule ima jedinstvenu vibracijsku frekvenciju, a što ovisi o čvrstoćama veza i masama ogranka molekula koje vibriraju. Uzimajući u obzir sve funkcionalne skupine molekule u određenoj namirnici, ovom metodom se može dobiti jedinstveni biljeg (*engl.* fingerprint) ciljne molekule ili makromolekule. Taj se jedinstveni biljeg u forenzici hrane koristi za određivanje identiteta molekula ili makromolekula prisutnih u hrani. Metoda IR nadograđena sa spektrometrom masa, a koja koristi Fourierovu transformacijsku tehniku, je postala standardizirana metoda za praćenje kakvoće namirnica jer je omogućila analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu (Amir i sur., 2013). Vrlo često se koristi "bliska" infracrvena spektroskopija (*engl.* Near-Infrared Spectroscopy, NIR) uz apsorpciju elektro-

magnetskog zračenja na valnim duljinama u rasponu od 500 do 2 500 nm. Na temelju spektara NIR može se odrediti zemljopisno i botaničko podrijetlo žitarica, voća, meda (Ruoff i sur., 2006) i kave (Meurens, 2003) te kvalitativno i kvantitativno uzorkovanje suncokretovog ulja u patvorenom maslinovom ulju (Downey i sur., 2002). Ova se metoda često koristi za određivanje udjela biljnih masnoća i aditiva u mliječnim proizvodima te za određivanje vrste mesa (slika 8, Cozzolino i Murray, 2004). Neinvazivnost NIR metode vrlo je korisna u prehrambenoj industriji za kontrolu kvalitete hrane tijekom i pri završetku proizvodnje (Alander i sur., 2013).

3.4. Ultrazvučna spektroskopija

Ultrazvučna spektroskopija (*engl.* Ultrasonic Spectroscopy, US) je brza, točna, nerazorna analitička metoda koja se zasniva na ultrazvuku niskih intenziteta ($<1\text{Wcm}^2$), a pogodna je za praćenje industrijskih procesa u realnom vremenu. Tri su parametra koja se najčešće mjere u ultrazvučnim eksperimentima, a to su brzina ultrazvuka, koeficijent prigušenja i akustična ili zvučna impedancija. Ovi parametri su u direktnoj vezi s fizikalnim svojstvima hrane kao što su kemijski sastav, struktura i fizičko stanje. Najjednostavnija korištena tehnika za ultrazvučna mjerenja je tehnika puls-jeka (slika 9, Awad i sur., 2012).



Slika 9. Tehnika puls-jeka (prilagođeno prema Awad i sur., 2012).

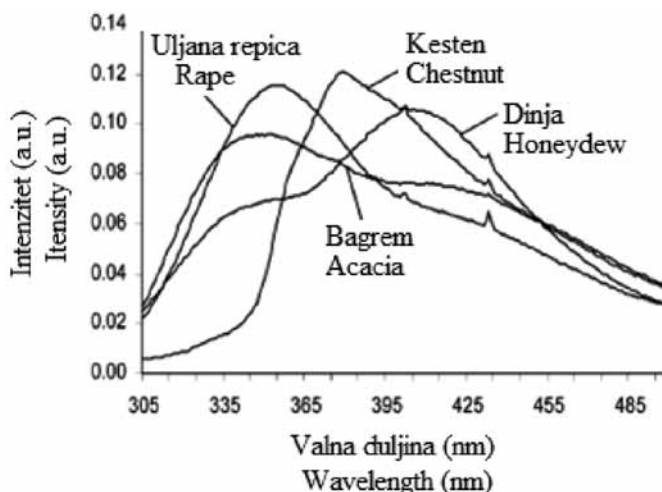
Figure 9. Pulse-echo technique (adapted from Awad et al., 2012).

Ova metoda se može koristiti za određivanje kemijskog sastava različitih prehrambenih proizvoda kao što su voće, mlijeko i mliječni proizvodi, meso (Benedito i sur., 2001), određivanje udjela šećera u voću tijekom skladištenja (Mizrach, 2004), praćenje denaturacije proteina (Povey i sur., 2011), određivanje raspodjele veličine čestica u neprozirnim prehrambenim sustavima u rasponu od 10 nm do 1 mm (Povey i sur., 1999) te otkrivanje oštećenja ambalažnog materijala i stranih tijela unutar pakovina (Brnčić i sur., 2009; Bosiljkov i sur., 2010). Ultrazvučna spektroskopija često se koristi i za određivanje reoloških svojstava ulja, kemijskog sastava ulja i udjela uljne faze u emulzijama (McClements i Povey, 1992),

praćenje kvarenja ulja tijekom prženja (Benedito i sur., 2007) kao i kontrolu patvorenja ulja (Raghupathi i sur., 1980).

3.5. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna spektroskopija (*engl.* Fluorescence Spectroscopy, FS) je metoda koja se temelji na činjenici da neke molekule, nazvane fluorofori, fluoresciraju kada su pobudene elektromagnetskim zračenjem. Fluorescentna spektroskopija je vrlo osjetljiva metoda i može identificirati i analizirati molekule koje imaju sposobnost fluorescencije i u vrlo niskim koncentracijama, u vrijednostima i do ppb. Ujedno se dobivaju informacije o strukturi, formulaciji i stabilnosti ciljnih molekula. Fluorescentnom spektroskopijom se mogu analizirati i tekući i kruti uzorci, stoga je vrlo pogodna za korištenje u forenzici hrane. Hrana koja sadrži proteine, peptide i slobodne aminokiseline je vrlo pogodna za analize jer su aminokiselinski ostaci triptofana, tirozina i fenilalanina fluorofori. Fluorescentna spektroskopija često se koristi za određivanje zemljopisnog i botaničkog podrijetla brojnih namirnica kao meda (slika 10, Ruoff i sur., 2004), patvorenja maslinovog ulja (Zandomenghi i sur., 2005) te utvrđivanja udjela mišićnog, masnog i vezivnog tkiva u različitim mesnim proizvodima (Skjervold i sur., 2003).



Slika 10. Normalizirani fluorescentni spektri različitih vrsta meda pri valnoj duljini pobuđivanja od 290 nm (prilagođeno prema Ruoff i sur., 2004).

Figure 10. Normalized fluorescence spectra of different honey types by excitation at 250 nm (adapted from Ruoff et al., 2004).

Aromatske aminokiseline, nukleinske kiseline, amino-kiselinski ostaci triptofana, riboflavin, vitamin A i klorofil su fluorescentne molekule prisutne u mliječnim proizvodima. Na osnovu fluorescentnih spektara triptofana i vitamina A može se utvrditi razlika između svježeg mlijeka, toplinski obrađenog (pri 70 °C, tijekom 20 minuta) i homogeniziranog mlijeka (Dufour i Riaublanc, 1997; Kulmyrzaev i sur., 2005). Fluorescentni spektri triptofana u kombinaciji s IR spektrom omogućavaju određivanje geografskog podrijetla (Austrija, Finska, Njemačka, Francuska i Švicarska) i vremena proizvodnje (ljetno ili zima) sira Ementerala (Karoui i sur., 2004). Fluorescentna spektroskopija u kombinaciji s matematičkim i statističkim metodama služi i za određivanje količine masti u mlijeku, uku-

pnog broja bakterija u sirovom mlijeku, praćenje oksidacijskih promjena u siru tijekom dozrijevanja te praćenje oksidacijske stabilnosti i kakvoće jogurta tijekom skladištenja (Becker i sur., 2003; Wold i sur., 2005). Fluorescentna spektroskopija može se koristiti i za određivanje svježine jaja pri čemu se kao fluorofori koriste aminokiselinski ostaci triptofana i vitamin A (Karoui i sur., 2006 a). Karoui i suradnici (2006 b) su također utvrdili da se fluorescentni spektri NADH mogu koristiti za razlikovanje svježih i smrznutih ili odmrznutih ribe.

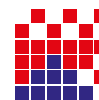
4. Separacijske metode

4.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (*engl.* Liquid Chromatography, LC) je separacijska metoda kojom se razdvajaju tvari na temelju razdiobi između dvije faze sustava: nepokretne i pokretne. Za određivanje pojedinih sastojaka hrane najčešće se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC) koja omogućava iznimnu reproducibilnost i razlučivost. Najčešće korištena kromatografska separacijska tehnika jest kromatografija obrnutih faza (*engl.* Reversed-Phase Chromatography) kao pokretnu fazu koristi polarno otapalo (npr. voda, metanol ili acetonitril), dok je nepokretna faza nepolarna, silika gel pokriven dugolančanim ugljikovodicima C8 ili C18. HPLC se primjenjuje za odjeljivanje organskih kiselina, vitamina, aminokiselina, šećera, aditiva, mikotoksina, pesticida, antibiotika, lipida, proteina i pigmenta. Koristeći kolone koje sadrže čestice $\geq 2 \mu\text{m}$ (*engl.* Ultra High Performance Liquid Chromatography, UPLC) omogućava se poboljšana razlučivost te kraće vrijeme analize. Nadogradnjom LC separacijskih metoda sa spektrometrom masa može se ne ciljano pristupiti analizi te detektirati i identificirati različite spojeve u namirnici bez korištenja standarda (Reuhs i Rounds, 2010)

4.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*engl.* Gas Chromatography, GC) je separacijska metoda kojom se mogu razdvajati plinovi i lako hlapive tvari. U ovoj metodi pokretna faza je plin, a nepokretna faza je tekućina ili krutina na koloni. Ona se provodi tako da se analizirani spojevi eluiraju pomoću plina kao pokretne faze uzduž kolone. Kao plinovi nosači mogu poslužiti He, Ar, N₂, CO₂, H₂. Spojevi koji se kromatografiraju mogu biti otopina ili plin, a injektiraju se preko injektora u struju plina nosača. Tijekom postupka po potrebi može doći do isparavanja supstancije koja onda nošena plinom nosačem ulazi u kolonu. Temperatura sustava za evaporaciju obično je 50 °C iznad vrelišta najteže isparljive sastavnice smjese. Postoje različiti detektori kao što su plameno-ionizacijski detektor, detektor termičke vodljivosti i detektor zahvata elektrona. Za pouzdanu identifikaciju odjeljenih spojeva sve više se koristi GC-MS sustav, dakle GC sustav nadograđen sa spektrometrom masa. Plinska kromatografija omogućava separaciju sastojaka plinovite smjese, a pomoću spektrometrije masa se karakterizira svaki sastojak individualno. Analize GC-MS se najčešće koriste za određivanje hlapivih i termostabilnih sastojaka hrane i kontaminanata (Barcarolo i sur., 1992; Mastovska i Lehotay, 2006; Yogendra-rajah i sur., 2013).



4.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (*engl.* Capillary Electrophoresis, CE) je separacijska tehnika kojom se mogu razdvojiti tvari na temelju razlike u njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti. Razdvajanje se može provesti na temelju razlike u odnosu naboja i masa, izoelektrične točke, molekularne veličine ili hidrofobnosti analita. Pomoću CE se analiziraju i karakteriziraju različiti analiti kao što su anorganski ioni, ugljikohidrati, peptidi, nukleinske kiseline, proteini te također virusi i mikroorganizmi prisutni u namirnicama (Kvasnička, 2005). U forenzici hrane koristi se za utvrđivanje geografskog podrijetla vina određivanjem ugljikohidrata, organskih kiselina, anorganskih aniona i kationa (Rovio i sur., 2011), botaničkog podrijetla meda određivanjem fenolnih spojeva (Andrade i sur., 1997), geografskog podrijetla meda određivanjem šećera (Rizelio i sur., 2012), sorte maslina određivanjem proteina (Montealegre i sur., 2012), određivanje kationa metala (kalij, kalcij, natrij, magnezij) u mlijeku i mliječnim proizvodima (Suarez-Luque i sur., 2007; Masotti i sur., 2012), određivanje melamina u mlijeku i mliječnim proizvodima, sladoledu i jajima (Xia i sur., 2010).

Zaključak

U ovom su radu prikazane analitičke metode koje se najčešće koriste u forenzici hrane. Opisanim analizama može se utvrditi odgovara li proizvedena hrana prikazanoj deklaraciji na prehrambenom proizvodu i da li je u skladu sa zakonskim propisima. Sve opisane metode imaju određene prednosti i nedostatke, međutim međusobnim kombinacijama različitih metoda mogu se dobiti izvanredno točni i ponovljivi podaci o svakom prehrambenom proizvodu. Odabir odgovarajuće analitičke metode uvjetovan je s više čimbenika kao što su točnost, preciznost, ponovljivost, granica detekcije i kvantifikacije, radno područje, selektivnost te vrstom uzorka. S ciljem dobivanja cjelovite slike o određenom proizvodu, kao što su kemijski sastav, zemljopisno podrijetlo i sljedivost, nužna je i statistička interpretacija multivarijantnih podataka dobivenih pojedinim analitičkim metodama, a što nije razmatrano u ovom radu.

Zahvala

Autori se zahvaljuju Ministarstvu znanosti, obrazovanja i sporta RH za financijsku pomoć na projektu broj 0583444-3466.

Literatura

Ahmed F. E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20, 215-223.

Alander J. T., Bocho V., Martinkauppi B., Saranwong S., Mantere T. (2013) A review of optical nondestructive visual and near-infrared methods for food quality and safety. *International Journal of Spectroscopy*, Article ID 341402, 36 doi:10.1155/2013/341402

Amir R. M., Anjum F. M., Khan M. I., Khan M. R., Pasha I., Nadeem M. (2013) Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 1018-1023.

Andrade P., Ferreres F., Gil M. I., Tomas-Barberan F. A. (1997) Determination of phenolic compounds in honeys with

different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60, 79-84.

Arleo M., Ruibal F., Pereyra J., Miquel E., Fernández M., Martínez C. A. (2012) DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams *International Food Research Journal*, 19, 1471-1477.

Aslan O., Hamill R. M., Sweeney T., Reardon W., Mullen A. M. (2008) Integrity of nuclear genomic DNA in cooked meat: implications for food traceability. *Journal of Animal Science*, 87, 57-61.

Awad T. S., Moharram H. A., Shaltout D., Asker D., Yousef M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food. *Food Research International*, 48, 410-427.

Baumann A. J. (2003) Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 434-445.

Barcarolo R., Casson P., Tutta C. (1992) Analysis of the volatile constituents of food by headspace GC-MS with reversal of the carrier gas flow during sampling. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 307-311.

Becker E., Christensen J., Frederiksen C. S., Haugaard V. K. (2003) Front-face spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: rapid analysis of riboflavin. *Journal of Dairy Science*, 86, 2508-2515.

Benedito J., Carcel J. A., Rossello C., Mulet A. (2001) Composition assessment of raw meat mixtures using ultrasonics. *Meat Science*, 57, 365-370.

Benedito J., Garcia-Perez J. V., Dobarganes C., Mulet A. (2007) Rapid evaluation of frying oil degradation using ultrasonic technology. *Food Research International*, 40, 406-414.

Benson S., Lennard C., Maynard P., Roux C. (2006) Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry- a review. *Forensic Science International*, 157, 1-22.

Blazkova M., Koets M., Wichers J. H., van Amerongen A., Fukal L., Rauch P. (2009) Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Pathogenic Bacteria from Food. *Czech Journal of Food Science*, 27, 350-353.

Bolhaar S. T., Ree R., Bruijnzeel-Koomen C. A., Knulst A. C., Zuidmeer L. (2004)

Allergy to jackfruit: a novel example of Bet v 1-related food allergy. *Allergy*, 59, 1187-1192.

Bosiljkov T., Karlović S., Tripalo B., Brnčić M., Ježek D., Rimac Brnčić S., Penava A., Karlović D. (2010) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta ("puls-jeka") u otkrivanju oštećenja ambalažnog materijala i stranih tijela unutar pakovanja. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 5, 31-37.

Brzezinski J. L. (2005) Detection of crustacean DNA and species identification using a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *Journal of Food Protection*, 68, 1866-1873.

Brnčić M., Markučić D., Omelić M., Tripalo B., Ježek D. (2009) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 4, 18-22.

Butorac A., Dodig I., Bačun-Družina V., Tishbee A., Mrvčić J., Hock K., Diminić J., Cindrić M. (2013) The effect of starvation stress on *Lactobacillus brevis* L62 protein profile

determined by de novo sequencing in positive and negative mass spectrometry ion mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, 1045–1054.

Chen Y., Chen Q., He L., Shang B., Zhang L. (2012) Enzyme immunoassay and liquid chromatography-fluorescence detection for amikacin in raw milk. *Food Chemistry* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.001>.

Choi M. Y., Choi W., Park J. H., Lim J., Kwon S. W. (2010) Determination of coffee origins by integrated metabolomic approach of combining multiple analytical data, *Food Chemistry*, 121, 1260–1268.

Chung S., Champagne E. T. (2011) Ferulic acid enhances IgE binding to peanut allergens in Western blots. *Food Chemistry*, 124, 1639–1642.

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. (2002) Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6273–6282.

Consolandi C., Palmieri L., Severgnini M., Maestri E., Marmioli N., Agrimonti C., Baldoni L., Donini P., De Bellis G., Castiglioni B. (2008) A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR–universal array analysis. *European Food Research and Technology*, 227, 1429–1438.

Costa J., Mafra I., Oliveira P. P. (2012) High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry* doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.077.

Cozzolino D., Murray I. (2004) Identification of animal meat muscles by visible and near-infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 37, 447–452.

Comstock S. S., McGranahan G., Peterson W. R., Teuber S. S. (2004) Extensive invitro cross-reactivity to seed storage proteins is present among walnut (*Juglans*) cultivars and species. *Clinical and Experimental Allergy*, 34, 1583–1590.

De Clerck E., Gevers D., De Ridder K., De Vos P. (2004) Screening of bacterial contamination during gelatine production by means of denaturing gradient gel electrophoresis, focussed on *Bacillus* and related endospore-forming genera. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1333–1341.

Downey G., McIntyre P., Davies A. N. (2002) Detecting and quantifying sunflower oil adulteration in extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by visible and nearinfrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5520–5525.

Dufour E., Riaublanc A. (1997) Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products, Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Le Lait*, 77, 657–670.

Ercolini D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297–314.

Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Rojas M., Pavón M. A., Hernández P. E., García T., Martín R. (2007) Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism *The Journal of AOAC International*, 90, 179–186.

Fasoli E., D’Amato A., Kravchuk A. V., Citterio A., Righetti P. G. (2011) In-depth proteomic analysis of non-alcoholic beverages with peptide ligand libraries. I: Almond milk and orgeat syrup. *Journal of proteomics*, 74, 1080–1090.

Frank T., Scholz B., Peter S., Engel K. H. (2011) Metabolite profiling of barley: Influence of the malting process. *Food Chemistry*, 124, 948–957.

Ganopoulos I., Argiriou A., Tsaftaris A. (2011a) Adulterations in Basmati rice detected quantitatively by combined use of microsatellite and fragrance typing with High Resolution Melting (HRM) analysis. *Food Chemistry*, 129, 652–659.

Ganopoulos I., Argiriou A., Tsaftaris A. (2011b) Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control*, 22, 532–541.

Ganopoulos I., Madesis P., Darzentas N., Argiriou A., Tsaftaris A. (2012) Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO “Fava Santorinis” (*Lathyrus clymenum*) adulterants. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.015.

Gaudin V., Hedou C., Sanders P. (2007) Validation of a Biacore method for screening eight sulfonamides in milk and porcine muscle tissues according to European Decision 2002/657/ EC. *The Journal of AOAC International*, 90, 1706–1715.

Haasnoot W., Marchesini G. R., Koopal K. (2006) Spree-ta-based biosensor immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder. *The Journal of AOAC International*, 89, 849–855.

Holzhauser T., Stephan O., Vieths S. (2006) polymerase chain reaction methods for the detection of allergenic foods. U : Detecting allergens in food. Koppelman, S. J., Hefle, S. L. (eds.) CRC Press New York.

<http://mobihealthnews.com/22691/prototype-iphone-biosensor-detects-viruses-bacteria-toxins-allergens/>. Pristupljeno 31.05.2013.

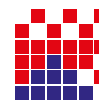
Karoui R., Dufour E., Pillonel L., Schaller E., Picque D., Cattenoz T., Bosset J. O. (2004) Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data. *European Food Research and Technology*, 219, 184–189.

Karoui R., Kempes B., Bamelis F., De Ketelaere B., Merten K., Schoonheydt R., Decuyper E., De Baerdemaeker J. (2006a) Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of egg freshness: 2–evolution of egg yolk. *European Food Research and Technology*, 223, 180–188.

Karoui R., Thomas E., Dufour E. (2006b) Utilisation of a rapid technique based on front-face fluorescence spectroscopy for differentiating between fresh and frozen–thawed fish fillets. *Food Research International*, 39, 349–355.

Kulmyrzaev A., Levieux D., Dufour E. (2005) Front-face fluorescence spectroscopy allows the characterization of mild heat treatment applied to milk. Relations with the denaturation of milk proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 502–507.

Kuipers O. P. (1999) Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high-throughput technologies for the



improvement of food microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 511-516.

Kvasnička F. (2005) Capillary electrophoresis in food authenticity. *Journal of Separation Science*, 28, 813-825.

Lee M. H., Cheon D.-S., Choi C. (2009) Molecular genotyping of *Anisakis* species from Korean sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Food Control*, 20, 623-626.

Liu G., Han Z., Nie D., Yang J., Zhao Z., Zhang J., Li H., Liao Y., Song S., De Saeger S., Wu A. (2012) Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay. *Food Control*, 27, 200-205.

Longobardi F., Casiello G., Sacco D., Tedone L., Sacco A. (2011) Characterisation of the geographical origin of Italian potatoes, based on stable isotope and volatile compound analyses. *Food Chemistry*, 124, 1708-1713.

Loo J. A., Kilby G. W. (2002) Electrospray mass spectrometry of peptides and proteins p.231-257 U: Applied Electrospray Mass Spectrometry: Practical Spectroscopy Series Vol. 32. Pramanik B. N., Ganguly A.K., Gross M. L., Dekker M. (eds.) Inc., New York, Basel, USA.

Masotti F., Erba D., De Noni I., Pellegrino L. (2012) Rapid determination of sodium in milk and milk products by capillary zone electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 95, 2872-2881.

Mastovska K., Lehotay S. J. (2006) Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7001-7008.

McClements D. J., Povey M. J. W. (1992) Ultrasonic analysis of edible fats and oils. *Ultrasonics*, 30, 383-388.

Meier-Augenstein W., Kemp H. F., Hardie S. M. L. (2012) Detection of counterfeit scotch whisky by 2H and 18O stable isotope analysis. *Food Chemistry* doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.084.

Mendez E., Vela C., Immer U., Janssen F. W. (2005) Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17, 1053-1063.

Montealegre C., García M. C., del Río C., Marina M. L., García-Ruiz C. (2012) Separation of olive proteins by capillary gel electrophoresis. *Talanta* doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.055.

Negrini R., Nicoloso L., Crepaldi P., Milanese E., Marino R., Perini D., Pariset L., Dunner S., Leveziel H., Williams J. L., Ajmone Marsan P. (2008) Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Science*, 80, 1212-1217.

Oh B. K., Kim Y. K., Bae Y. M., Lee W. H., Choi J. W. J. (2002) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786.

Ortola-Vidal A., Schnerr H., Rojmyr M., Lysholm F., Knight, A. (2007) Quantitative identification of plant genera in food products using PCR and Pyrosequencing technology. *Food Control*, 18, 921-927.

Pascoal A., Ortea I., Gallardo J. M., Cañas B., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P. (2012) Species identification of

the Northern shrimp (*Pandalus borealis*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and proteomic analysis. *Analytical Biochemistry*, 421, 56-67.

Peng J., Song S., Xu L., Ma W., Liu L., Kuang H., Xu C. (2013) Development of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Peanut Allergen Ara h 1 in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 2897-2905.

Pérez E. M. S., Iglesias M. J., Ortiz F. L., Pérez I. S., Galera M. M. (2010) Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemistry*, 122, 877-887.

Pomes A., Helm R. M., Bannon G. A., Burks A. W., Tsay A., Chapman M. D. (2003) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 640-645.

Povey M. J. W., Moore J. D., Braybrook J., Simons H., Belchamber R., Raganathan B., Pinfield V. (2011) Investigation of bovine serum albumin denaturation using ultrasonic spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25, 1233-1241.

Pohanka M., Jun D., Kuca K. (2007) Mycotoxin assays using biosensor technology: a review. *Drug and chemical toxicology*, 30, 253-261.

Povey M. J. W., Golding M., Higg, D., Wang Y. (1999) Ultrasonic spectroscopy studies of casin in water. *International Dairy Journal*, 9, 299-303.

Primrose S., M. Woolfe M., Rollinson S. (2010) Food forensics methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 582-590.

Raghupathi R. C., Siva R. C., Prabhu C. A. R. (1980) Study of adulteration in oils and fats by ultrasonic method. *Current Science*, 49, 185-186.

Ramos A. M., Megens H. J., Crooijmans R. P., Schook L. B., Groenen M. A. (2011) Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing. *Animal Genetics*, 42, 613-620.

Reindl J., Rihs H. P., Scheurer S., Wangorsch A., Haustein D., Vieths S. (2002) IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *International Archives of Allergy and Immunology*, 128, 105-114.

Rochfort S., Ezernieks V., Bastian S. E. P., Downey M. O. (2010) Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*, 121, 1296-1304.

Rossmann A. (2001) Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*, 17, 347-381.

Rounsley S. D., Last R. L. (2010) Shotguns and SNPs: how fast and cheap sequencing is revolutionizing plant biology. *The Plant Journal*, 61, 922-9227.

Rovio S., Sirén K., Sirén H. (2011) Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, organic acids and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. *Food Chemistry*, 124, 1194-1200.

Ruoff K., Karoui R., Dufour E., Luginbuhl, W., Bosset J. O., Bogdanov S., Amado R. (2005) Authentication of the botanical origin of honey by front face fluorescence spectroscopy, A Preliminary Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1343-1347.



- Ruoff K., Luginbühl W., Künzli R., Iglesias M. T., Bogdanov S., Bosset J. O., von der Ohe K., von der Ohe W., Amadó R. (2006) Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 6873-6880.
- Sanmartin E., Arbolea J.C., Iloro I., Escuredo K., Elortza F., Moreno F. J. (2012) Proteomic analysis of processing by-products from canned and fresh tuna: identification of potentially functional food proteins. *Food Chemistry* doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.177.
- Satoh R., Nakamura R., Komatsu A., Oshima M., Teshima R. (2011) Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 437-444.
- Schellenberg A., Chmielusz S., Schlicht C., Camin F., Perini M., Bontempo L., Heinrich K., Kelly S. D., Rossmann A., Thomas F., Jamin E., Horacek M. (2010) Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. *Food Chemistry*, 121, 770-777.
- Schipilliti L., Dugo P., Bonaccorsi I., Mondello L. (2012) Authenticity control on lemon essential oils employing Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS). *Food Chemistry*, 131, 1523-1530.
- Schmidt O., Quilter J. M., Bahar B., Moloney A. P., Scrimgeour C. M., Begley I. S. (2005) Inferring the origin and dietary history of beef from C, N, and S stable isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, 91, 545-549.
- Sentandreu M. A., Sentandreu E. (2011) Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Science*, 89, 280-285.
- Siegel M., Schnur K., Boernsen B., Pietsch K., Waiblinger H. U. (2012) First ring-trial validation of real-time PCR methods for the quantification of allergenic food ingredients. *European Food Research and Technology*, 235, 619-630.
- Situ C., Mooney M. H., Elliott C. T. (2010) Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high throughput food safety analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 29, 1305-1315.
- Skjervold P. O., Taylor R. G., Wold J. P., Berge P., Abouelkaram S., Culioli J., Dufour É. (2003) Development of Intrinsic Fluorescent Multispectral Imagery Specific for Fat, Connective Tissue, and Myofibers in Meat. *Journal of Food Science*, 68, 1161-1168.
- Suarez-Luque S., Mato I., Huidobro J.F., Simal-Lozano J. (2007) Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, 17, 896-901.
- Surowiec I., Koistinen K.M., Fraser P.D., Bramley P.M. (2011) Proteomic approach for the detection of chicken mechanically recovered meat. *Meat Science*, 89, 233-237.
- Thornton C.R., Slaughter D.C., Davis R.M. (2010) Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody based ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 166-172.
- Van Herwijnen, R. (2006) The use of lateral flow devices to detect food allergens. U: Detecting allergens in food. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.) CRC Press, New York, USA.
- Walczyk T. (2001) The potential of inorganic mass spectrometry in mineral and trace element nutrition research. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 370, 444-453.
- Wasva J., Irudayaraj J., DebRoy C. (2007) Direct detection of E. coli O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor. *LWT- Food Science and Technology*, 40, 187-192.
- Weder J. K. P. (2002) Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 504-511.
- Wensing M., Knulst A. C., Piersma S., O'Kane F., Knol E. F., Koppelman S. J. (2003) Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 420-424.
- Woolfe M., Primrose S. (2004) Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology*, 22, 222-226.
- Wold J. P., Veberg A., Nilsen A. (2005) The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *International Dairy Journal*, 15, 343-353.
- Xia J., Zhou N., Liu Y., Chen B., Wu Y., Yao S. (2010) Simultaneous determination of melamine and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Food Control*, 21, 912-918.
- Xu Z., Deng H., Deng X. F., Yang J., Jiang Y., Zeng D., Huang F., Shen Y., Lei H., Wang H., Sun Y. (2012) Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 131, 1569-1576.
- Yeung J. (2006) Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. U: Detecting allergens in foods. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.) CRC Press, Washington, USA.
- Yogendrarajah P., Van Poucke C., De Meulenaer B., De Saeger S. (2013) Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices. *Journal of Chromatography A*, 1297, 1-11.
- Yman I. M., Eriksson A., Johansson M. A., Hellenas K. E. (2006) Food allergen detection with biosensor immunoassays. *The Journal of AOAC International*, 89, 856-861.
- Zheng C., Wang X., Lu Y., Liu Y. (2012) Rapid detection of fish major allergen parvalbumin using superparamagnetic nanoparticle-based lateral flow immunoassay. *Food Control*, 26, 446-452.
- Zakon o hrani (NN br. 46/07, 55/11)
- Zakon o zdravstvenoj ispravnosti i zdravstvenom nadzoru nad namirnicama i predmetima opće uporabe (NN br. 1/97)
- Zakon o oznakama izvornosti, oznakama zemljopisnog podrijetla i oznakama tradicionalnog ugleda poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda (NN br. 50/12)