

PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Instrumentne tehnike u analizi mlijeka i mliječnih proizvoda

## *Instrumental techniques in the analysis of milk and dairy*

Iva Palac Bešlić<sup>1\*</sup>, Rajka Božanić<sup>2</sup>, Adela Krivohlavek<sup>1</sup><sup>1</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, Mirogojska cesta 16, 10000 Zagreb, Hrvatska<sup>2</sup> Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Corresponding author: iva.palacbeslic@stampar.hr

### Sažetak

Zbog široke konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda diljem svijeta, vrlo je važna analiza mlijeka odnosno određivanje njegove zdravstvene ispravnosti kao i autentičnosti i geografskog porijekla. Kvalitetu mlijeka i njegovih proizvoda određuju njegove sastavnice kao što su spektar masnih kiselina, aromatski profil, sastav mineralnih tvari ili vitamina. Kvalitetu mliječnih proizvoda mogu narušiti prisutnost kontaminanata kao što su ostatci veterinarskih lijekova, pesticida ili otrovnih tvari topivih u mastima (dioksini ili poliklorirani bifenili). Za sve analize potrebne za određivanje zdravstvene ispravnosti ili autentičnosti mliječnih proizvoda na raspolaganju je više instrumentnih tehnika; kromatografske, spektrometrijske, tehnike, tehnike atomske spektroskopije te analize izotopnog sastava koja spaja više tehnika u jednoj analizi.

**Ključne riječi:** mlijeko, mliječni proizvodi, zdravstvena ispravnost, kromatografija, spektrometrija, izotopni sastav

### Abstract

Due to the worldwide consumption of milk and dairy, analysis is very important, i.e. to determine its safety as well as its authenticity and geographical origin. The quality of milk and dairy is determined by its components, such as the spectrum of fatty acids, the aromatic profile, and the composition of minerals or vitamins. The quality of dairy products can be impaired by the presence of contaminants such as residues of veterinary drugs, pesticides or fat-soluble toxic substances (dioxins or polychlorinated biphenyls). Various instrumental techniques are available for all analyses required to determine dairy products' safety or authenticity; chromatographic, spectrometric, atomic spectroscopy and analysis of isotopic composition, which combines several techniques in one analysis.

**Keywords:** milk, dairy products, health correctness, chromatography, spectrometry, isotopic composition

### UVOD

Mlijeko i mliječni proizvodi neizostavan su dio svakodnevne prehrane svih slojeva stanovništva, što se očituje i u vrlo velikoj ponudi mliječnih proizvoda, poput skute, jogurta, sira, maslaca i drugih proizvoda. Svi proizvodi prolaze kroz kontrole kvalitete kako bi mlijeko i mliječni proizvodi bili sigurni za konzumaciju. Uz analizu sastojaka (kao što je analiza nutritivne vrijednosti, spektar masnih kiselina ili vitamina) vrlo je važno testiranje ostataka pesticida i drugih kontaminanata (uključujući veterinarske lijekove, ostatke pesticida, dioksine, aflatoksin) ili testiranje na genetski modificirane organizme (GMO). Široka konzumacija mlijeka i mliječnih proizvoda čini ove namirnice metama za potencijalno krivotvorenje. Uobičajene krivotvorine mliječnih proizvoda su zamjena mlijeka veće vrijednosti nedeklariranim mlijekom. Određivanje vrste mlijeka važno je u proizvodnji sira, osobito one napravljene od jedne vrste mlijeka sa zaštićenom oznakom izvornosti (eng. protected designation of origin; PDO), kao što su ovčji ili kozji sirevi. Obzirom na ekonomski i prehrambeni značaj mlijeka, a posebno kravljeg, nije iznenađujuće da je kravlje mlijeko bilo predmet detaljne kemijske i nutritivne analize dugi niz godina. Na razini makronutrijenata, kravlje mlijeko se sastoji od vode, masti, bjelančevina i ugljikohidrata. Na mikrorazini hranjivih tvari, kravlje mlijeko sadrži mnoge bioaktivne spojeve uključujući vitamine, mineralne tvari, biogene amine, organske kiseline, nukleotide, oligosaharide i imunoglobuline. Čimbenici koji utječu na sastav mlijeka uključuju metaboličku aktivnost unutar mliječne žlijezde i tkiva, opće zdravstveno stanje vimena, vrstu hrane koju životinja konzumira, aktivnost i prisutnost određenih mikroorganizama, kao i mikrobnu aktivnost i enzimske reakcije koje se odvijaju unutar sirovog mlijeka. Sastav mlijeka također varira ovisno o pasmini goveda, stupanju laktacije, razini pariteta, broj održivih trudnoća, kao i postupcima obrade nakon sakupljanja mlijeka (Foroutan i sur., 2019).

Upotreba pesticida u modernoj poljoprivredi odigrala je veliku ulogu u povećanju poljoprivredne produktivnosti; međutim, njihova zloraba sve je veći problem. Takva zloraba može dovesti do prijenosa ostataka pesticida na stočne proizvode. Pesticidi su danas sveprisutni u okolišu i obično se nalaze u stočarskim proizvodima, što dovodi do njihovog uključivanja u prehrambeni lanac. Putevi kojima je stoka izložena pesticidima uključuju upijanje kožom, udisanje i gutanje. Apsorbirane tvari se zatim mogu metabolizirati ili akumulirati u tijelu (Kang i sur., 2020a). Mlijeko i mliječni proizvodi ne smiju sadržavati neugodne okuse ili mirise, abnormalne boje, moraju imati mali broj bakterija; nisku dozu kemikalija (npr. antibiotika, deterdženata); te biti normalnog nutritivnog sastava i kiselosti. Kako bi se to postiglo, testiranje i kontrolu kvalitete treba provoditi u svim fazama mliječnog lanca.



## PLINSKA KROMATOGRAFIJA

### *Analiza masnih kiselina*

Mlijeko je emulzija u kojoj su lipidi strukturirani u kuglice mliječne masti (eng. milk fat globules MFG). Takve kuglice mliječne masti u unutrašnjosti sadrže nepolarne lipide, uglavnom triacilglicerole (TAG), ali i kolesteril-esterei i druge manje lipide, prekrivene membranom koja sadrži amfipatske lipide i proteine. Mliječna mast, koja se sastoji od 97 do 98% triacilglicerola (TAG), izvor je energije i hranjivih tvari te važan sastojak koji osigurava poželjne karakteristike teksture i okusa (Park i sur., 2014). Sastav masnih kiselina (FA) mliječne masti čini 70% zasićenih masnih kiselina, 25% mononezasićenih masnih kiselina i 5% polinezasićenih masnih kiselina. U mlijeku su također prisutne manje količine diacilglicerola, monoacilglicerola, slobodnih masnih kiselina (eng. free fatty acid, FFA), fosfolipida, glikolipida i sterola. U tragovima su prisutni vitamini topivi u mastima, karoteni i arome topive u mastima. Većina masnih kiselina prisutnih u mliječnoj masti je esterificirana u triacilglicerole ili fosfolipide. Neesterificirane masne kiseline (slobodne masne kiseline, FFA) primarno nastaju u mliječnim proizvodima enzimskom razgradnjom glicerida. Najčešće korištena metodologija za odvajanje i analizu mliječnih masnih kiselina je plinska kromatografija (GC), povezana s detektorom plamene ionizacije (GC-FID). Ova metodologija obično uključuje sljedeće korake:

- (1) ekstrakciju lipida;
- (2) frakcioniranje klasa lipida, ako je cilj analize sadržaj masnih kiselina jedne ili više frakcija zasebno; međutim, za analizu ukupnih masnih kiselina u uzorku mlijeka (eng. total fatty acid, TFA), ovaj korak se preskače i pretpostavlja se da masne kiseline uglavnom potječu od triacilglicerola te mali udio od fosfolipida i slobodnih masnih kiselina;
- (3) pretvorbu masnih kiselina u metil estere masnih kiselina (eng. fatty acid methyl ester, FAME);
- (4) kromatografsko odvajanje i analiza plinskim kromatografom.

Početni korak u analizi bilo koje vrste lipida prisutnih u mliječnoj masti sastoji se od odvajanja lipida od ostalih komponenti hrane, odnosno ukljanjanje matrice uzorka. Pri analizi ukupnih masnih kiselina (eng. total fatty acid, TFA) u mliječnim proizvodima glavna strategija je korištenje smjesa otapala širokog raspona polarnosti, primjerice kloroform-metanol-voda. Smjesa otapala takvih značajki omogućuje ekstrakciju gotovo svih lipida prisutnih u uzorcima. Pročišćeni ekstrakt lipida u konačnici se dobiva u sloju odvojenog kloroforma. Bilo koja metoda za točnu kvantifikaciju pojedinačnih masnih kiselina mora biti učinkovita u ekstrakciji kratkolančanih masnih kiselina topljivih u vodi i neesterificiranih masnih kiselina topivih u organskim otapalima. Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju masnih kiselina su metanol, etanol, n-butanol, 2-butanol, izopropanol, kloroform, dietil eter, n-heksan, n-heptan i petrol eter. Najčešće se dodaje kiselina (uglavnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ili HCl), kako bi se kiselinsko-bazna ravnoteža pomaknula prema protoniranim oblicima neesterificiranih masnih kiselina koji su organski topljiviji. Ekstrakcija tekuće-kruto dobra je alternativa za izolaciju masnih kiselina kako bi se skratilo vrijeme analize. Temelji se na adsorpciji lipida na čvrsti adsorbent i njegovom naknadnom desorpcijom pomoću otapala. Maxwell i suradnici (1986) opisali su postupak izolacije lipida za mlijeko eluiranjem otapala iz kolone koja sadrži Celite 545. Ukupni lipidi su izolirani eluiranjem sa 90:10 smjesom diklorometana:metanola. U nekim slučajevima, analiza TFA provodi se izravnom derivatizacijom bez prethodne izolacije lipida. Čini se da ove metode dobro funkcioniraju za mlijeko čija je koncentracija lipida niska. Ukoliko je potrebno odrediti samo hlapive kratkolančane masne kiseline, ali ne i cijeli raspon FFA općenito se analiziraju tehnikom plinskog kromatografa uz detektor maseng spektrometra, GC-MS uz prethodni korak ekstrakcije i/ili pretkoncentracija. Metilacija se provodi kiselim i bazičnom katalizom. Kiselinom katalizirana metilacija smatra se kvantitativnim jer pretvara masne kiseline iz svih klasa lipida prisutnih u uzorku u njihove metilirane estere. Za reakcije derivatizacije, često korišteno sredstvo za derivatizaciju je tetrametilamonijev hidroksid, radi

pretvaranja slobodnih masnih kiselina u FAME prije GC-FID analize zbog njegove sposobnosti da istovremeno stvara metilne estere glicerida i tvori soli FFA (koje se zatim pretvore u metilne estere u zagrijanom injektoru) u odvojenim fazama. To omogućuje analizu obje komponente lipidnog ekstrakta bez potrebe za prethodnim odvajanjem. Gliceridne komponente ekstrahiranih lipida stvaraju interferenciju pri određivanju slobodnih masnih kiselina. GC-FID je daleko najčešće korištena metoda za odvajanje, analizu i kvantificiranje FAME iz mliječne masti. Za analizu su dostupne različite kromatografske kolone i različita punjenja. Glavna prednost kolone sa stacionarnom fazom visokog polariteta je njihova visoka sposobnost kromatografskog razdvajanja nezasićenih FAME, posebno za odvajanja cis i trans izomera. Kada je cilj analizirati opći profil (glavne masne kiseline i njihove udjele), kolone od 30 do 50 m daju dobru rezoluciju, u osjetno kraćem vremenu analize od duljih kolona. Primjerice, Ezequiel i sur. (2015) odvojili su oko 30 masnih kiselina iz uzoraka kravljeg mlijeka za 57 minuta. Uspješno su analizirali cis9, trans11-C18:2, konjugirane linolne kiseline unutar grupe zasićenih masnih kiselina, monozasićene (eng. monosaturated fatty acid, MUFA) i polizasićene masne kiseline (eng. polysaturated fatty acids, PUFA) s brojem ugljikovih atoma od C4 do C22. Dugačke kolone od 60 ili 100 metara imaju sposobnosti odvojiti više izomera nezasićenih masnih kiselina (posebice onih od 16 ili 18 ugljikovih atoma). U svrhu postizanja dobre rezolucije C18:1 trans izomera u mliječnoj masti, neki autori kombinirali GC s nekom vrstom Ag+-kromatografije, prvenstveno za frakcioniranje cis i trans izomera prije GC analize, kako bi se osiguralo ispravno odvajanje, identifikacija i kvantifikacija svih izomera (Momčilova i Nikolova-Damyanova, 2012) Iako postoje druge kromatografske metode za odvajanje i kvantificiranje masnih kiselina, najpopularnija metoda analize uključuje GC-FID zbog svoje preciznosti i pouzdanosti te relativno niskog troška. FID ne pruža strukturne informacije o spojevima, pa se identifikacija masnih kiselina temelji na retencijskom vremenu ili relativnim parametrima zadržavanja u usporedbi s čistim referentnim tvarima. Ipak, zbog ogromnog broja različitih masnih kiselina prisutnih u mlijeku u različitim koncentracijama, ograničene dostupnosti komercijalnih standarda i pojava interferencija, identifikacija nekih manjih masnih kiselina je teška. Kvantitativno određivanje masnih kiselina provodi se mjerenjem površina pod kromatografskim signalima. Kada se koristi FID kao detektor, ova površina je proporcionalna količini analita koji se eluira iz kolone, unutar svojih granica linearnosti. Unatoč tome, za svaki FAME potrebno je točno izračunati faktore odziva korištenjem pripremljenih čistih standardnih otopina poznatih koncentracija iz komercijalno dostupnih pojedinačnih standarda ili standardnih smjesa. Nakon što je izračunat faktor odziva za individualne masne kiseline, iskazuju se rezultati analize uzorka, u većini slučajeva, kao težinski postotak pojedinačnih masnih kiselina u odnosu na zbroj svih detektiranih masnih kiselina (metoda normalizacije, eng. area normalization method). Za točniju procjenu količine svake masne kiseline prisutne u složenom uzorku, potrebno je primijeniti metodu unutarnjeg standarda, u kojoj se iskorištenje svake masne kiseline temelji na iskorištenju internih standarda (obično neke masne kiseline koja nije prisutna u mliječnoj masti). U analizi ukupnih masnih kiselina iz mliječne masti, najčešće korišteni interni standardi su C9:0 (Quigley i sur., 2018) i C19:0 (Alves i Bessa, 2009).

### *Analiza pesticida i veterinarskih lijekova*

Korištenje pesticida u modernoj poljoprivredi ima veliku ulogu u povećanju poljoprivredne produktivnosti; međutim, njihova zlouporaba sve je veći problem. Takva zlouporaba može dovesti do prijenosa ostataka pesticida u stočarske proizvode. Pesticidi su sveprisutni u okolišu te ih nalazimo i u stočarskim proizvodima, što dovodi do njihovog uključivanja u hranidbeni lanac (Kang i sur., 2020b). U Republici Hrvatskoj pesticidi se određuju sukladno Uredbi (EZ) br. 396/2005 ('Uredba - 396/2005 - EN - EUR-Lex', ) o maksimalnim razinama ostataka pesticida u ili na hrani i hrani za životinje biljnog i

životinjskog podrijetla kojom su propisane definicije ostataka pesticida, te gdje su navedene maksimalno dozvoljene razine ostataka pesticida. Europska unija propisuje listu aktivnih tvari koje se moraju analizirati Uredbom 731/2023 ('Implementing regulation - 2023/731 - EN - EUR-Lex', ) o koordiniranom višegodišnjem programu kontrole pesticida. Trenutno je većina organoklorinih pesticida zabranjena, ali se ipak nalaze u okolišu. Primjerice, prema kategorizaciji UN-a Programa zaštite okoliša aldrin i dieldrin su poznati kao postojani organski zagađivači. Iako su organofosforni pesticidi razgrađivi, imaju tendenciju korištenja u velikim količinama, stoga je potrebno kontinuirano praćenje njihovih koncentracija u hrani.

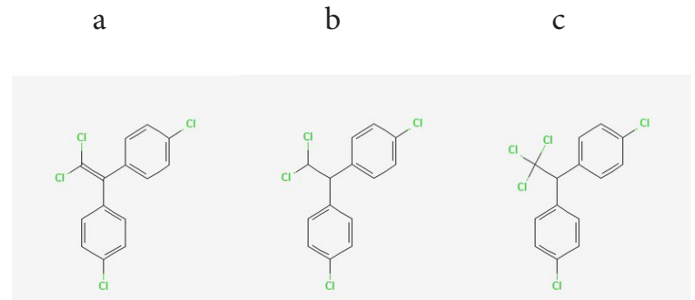
Za određivanje niske koncentracije višerezidualnih pesticida u stočarskim proizvodima neophodan je razvoj metode temeljene na detekciji masenom spektrometrijom (MS). Najučinkovitiji pristup analizi pesticida je praćenje više odabranih reakcija, skraćeno MRM metoda (eng. multiresidual monitoring) kojom se može analizirati širok spektar pesticida. Drugi način praćenja odjeljivanja analita spektrometrijom masa je praćenje odabrane reakcije, SRM metoda (eng. single residual method).

Detektiranje odabrane reakcije iona zasniva se na reakciji raspada iona koji su karakteristični za analizirani pesticid. Praćenje odabranih reakcija sastoji se u biranju iona (ion perkursor), razlaganju odabranog iona kolizijom s molekulama plina (argon) i praćenju iona nakon kolizije (ioni produkti). Identifikacija se provodi usporedbom retencijskog vremena pesticida u uzorku sa retencijskim vremenom istog pesticida u otopini certificiranog referentnog materijala, a kvantifikacija se provodi usporedbom površina signala pesticida u uzorku prema površini pesticida u otopini certificiranog referentnog materijala. Validacijom metode potvrđuje se njezina prikladnost za određivanje masenog udjela pesticida u voću i povrću. U provedbi validacije sudjeluju odgovorni analitičari i tehničari prema matrici odgovornosti. Za svaki validacijski eksperiment koriste se certificirani referenti materijali te umjerene automatske pipete i oprema. Kriteriji prihvatljivosti za rezultate validacijskih eksperimenata preuzeti su iz važećeg SANTE dokumenta (Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed).

Validacija metode za određivanje pesticida uključuje određivanje specifičnosti metode, linearnosti, iskorištenja metode granice kvantifikacije i granice detekcije metode.

Doista, razvoj i provjera analitičkih metoda za ostatke pesticida u raznim prehrambenim proizvodima su bitne za osiguranje sigurnosti hrane. Jedan od glavnih nedostataka s obzirom na analizu ovih kontaminanata u mlijeku i mliječnim proizvodima je što visok sadržaj proteina i masnoće često može ometati analitičko određivanje. Sukladno tome, postupak prethodne obrade uzorka i/ili ekstrakcije uključuje nekoliko koraka čišćenja za uklanjanje smetnji iz matrice, što često stvara veliku potrošnju resursa poput vremena ili otapala. Postoje mnoge metode pripreme uzoraka objavljene u literaturi za određivanje ostataka pesticida kao što je ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. solid phase extraction; SPME) (Beltran i sur., 2000) disperzivna mikroekstrakcija tekućina-tekućina (eng. dispersive liquid-liquid microextraction; DLLME) (Ahmad i sur., 2015), gel permeacijska kromatografija (eng. gel-permeable chromatography; GPC) (Yang i sur., 2012) i QuEChERS (eng. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe; brzo, jednostavno, jeftino, učinkovito, robusno i sigurno). Iako tekućinsko-tekuća ekstrakcija i ekstrakcija na čvrstoj fazi su najčešće korišteni procesi u uvjetima pripreme uzoraka za analizu pesticida, ti procesi zahtijevaju puno vremena, a velike količine otrošnog otapala potrebnog za pripremu i obradu uzorka mogu biti štetne za okoliš. Dakle, QuEChERS metoda je popularna alternativa za pripremu analitičkih uzoraka za analizu pesticida i veterinarskih lijekova. Najčešće, podjela je takva da se uzorci voća, povrća te mliječnih proizvoda s manjim udjelom masti analiziraju plinskom kromatografijom s dvostrukom spektrometrijom masa uz pripremu uzoraka klasičnim QUECHERS postupkom dok se kompliciraniji uzorci s većim udjelom masti moraju iscrpnije pročišćavati (primjerice gel-permeacijskom kromatografijom; GPC) prije same instrumentalne analize. U slučaju,

primjerice maslaca ili vrhnja gdje je vjerojatnija prisutnost ostataka organoklorinih pesticida, adekvatniji odabir je ekstrakcija pesticida otapalom, uz pročišćavanje gel-permeacijskom kromatografijom i analizom plinskim kromatografom u detektor zahvata elektrona (GC-ECD). Diklorodifeniltrikloroetan (DDT) i ostaci njegovih derivata pronađeni su u uzorcima sirovog kravljeg mlijeka u različitim zemljama. Naime Kolumbija, Egipat, Hrvatska, Indija, Etiopija, Sudan, Pakistan, Uganda, Turska, Meksiko, Poljska i Rumunjska analizirani su na DDT i njegove derivate. pp-DDT je najčešće prijavljeni derivat DDT-a, praćen u dvadeset studija u četrdeset i šest regija diljem svijeta, nakon čega slijedi pp-DDE (Boudebbouz i sur., 2022).



Slika 1. Kemijske strukture pesticida: (a) DDE (b) DDD (c) DDT ('Clofenotane | C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>5</sub> | CID 3036 - PubChem', ; 'p,p'-DDD | C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>4</sub> | CID 6294 - PubChem', ; 'p,p'-DDE | C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub> | CID 3035 - PubChem', )

Figure 1. Pesticides chemical structures: (a) DDE (b) DDD (c) DDT

Kako acetonitril koji se koristi kao otapalo u QuEChERS postupku ne otapa značajno masti ili polarne (proteini, šećeri) komponente matriksa, to je prikladno otapalo za ekstrakciju mliječnog matriksa. Acetonitril olakšava raspad proteina u mlijeku što u konačnici dovodi do razbijanja emulzije. Mliječni proteini i druge krute tvari lako se istalože, i dobiven je proziran bezbojni supernatant (Jadhav i sur., 2019). Postoji i nekoliko generičkih metoda (Zhan i sur., 2012) koje se mogu primjeniti za istovremenu analizu različitih kontaminanata, ali su iskorištenja nepolarnih spojeva koje se uobičajeno analiziraju plinskom kromatografijom niska (npr. klorirani ugljikovodici, sintetski piretroidi). QuEChERS metoda je izvorno razvijena za ekstrakciju i analizu ostataka pesticida, ali je predložena kao prikladna za višerazrednu analizu ostataka veterinarskih lijekova u matricama hrane životinjskog podrijetla. Međutim, ova metoda ne može ponuditi odgovarajuće iskorištenje polarnih lijekova (npr. penicilini, tetraciklini i kinoloni), koji se često koriste u mljekarstvu. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje, predložena je metoda isaljavanja podržana tekućom ekstrakcijom (eng. salting out supported liquid extraction; SOSLE) (Kaufmann i sur. 2014). Spomenuti postupak koristi visoku koncentraciju amonijevog sulfata što omogućuje poboljšanu ekstrakciju i učinkovitost za ostatke polarnih veterinarskih lijekova. Alternativni pristup za ovu klasu spojeva također su predložili Chung i Lam (Chung i Lam, 2015) gdje je ekstrakcija mlijeka provedena acetonitrilom, nakon čega je slijedila particioniranje kroz korak zamrzavanja i odvojenu analizu vodene i organske faze korištenjem različitih kromatografskih sustava za polarne i relativno srednje polarne veterinarske lijekove.

### Analiza polikloriranih bifenila, dioksina i furana

Slično pesticidima, mnogi negativni učinci na ljudsko zdravlje zabilježeni su za poliklorirane bifenile (eng. polychlorinated biphenils; PCB), dioksine i furane (PCDDs i PCDFs.) uključujući poremećaje reproduktivnih organa i procesa, bolesti imunološkog sustava, neurološke poremećaje i karcinome. Iako su spojevi zabranjeni, njihovi se ostaci često detektiraju u hrani, posebno u hrani životinjskog podrijetla. Postoji niz regulativa unutar Europske unije koji reguliraju razinu ovih spojeva u hrani.

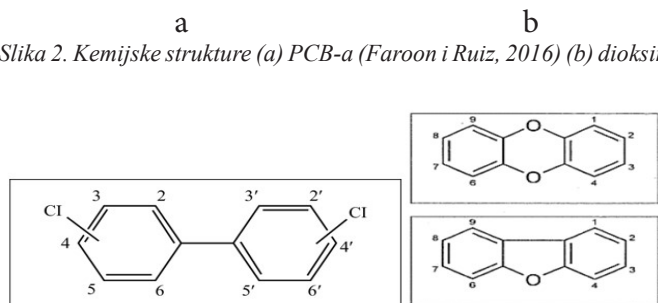
EFSA Panel o kontaminantima u prehrambenom lancu (CONTAM). Rizik za zdravlje životinja i ljudi povezan s prisutnošću dioksina i dioksinima sličnih PCB-a u stočnoj hrani i hrani (Knutsen i sur., 2018). Uredba Komisije (EU). 1259/2011 od 2. prosinca 2011. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 u pogledu najvećih dopuštenih količina dioksina, PCB-a sličnih dioksinima i PCB-a koji nisu slični dioksinima u hrani ('Commission Regulation (EU) No. 1259/2011 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. | FAOLEX').

Uredba Komisije (EU). 277/2012 od 28. ožujka 2012. o izmjeni priloga I. i II. Direktive 2002/32/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu najvećih dopuštenih količina i pragova djelovanja za dioksine i poliklorirane bifenile ('as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs (Text with EEA relevance).

Preporuka Komisije od 3. prosinca 2013. o smanjenju prisutnosti dioksina, furana i PCB-a u hrani za životinje i hrani (2013/711/EU) (laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012 (Text with EEA relevance) 2014).

Brojne studije pokazale su njihove ostatke u mlijeku iznad kvantifikacijskih granica primijenjenih metoda i, u nekim slučajevima, vrlo visoke koncentracije (Boudebouz i sur., 2022; Gill i sur., 2020; Jia i sur., 2022). Prema bazi podataka o razinama PCB-a u mlijeku iz različitih europskih zemalja, izračunata je srednja vrijednost PCB-a od 10,7 g kg<sup>-1</sup> (Fattore i sur., 2008; Knutsen i sur., 2018). Mlijeko i mliječni proizvodi ključni su izvori ljudske izloženosti PCB-ima. PCB ulazi u tijelo stoke koja proizvodi mlijeko uglavnom kroz konzumaciju kontaminirane vode i stočne hrane. PCB, dioksini i furani su spojevi koji su topivi u mastima te tvari koje dugo ostaju u tijelu (Yaminifar i sur., 2021). Zbog svoje stabilnosti i lipofilnosti (slika 2), prvenstveno se nakupljaju u masnom tkivu i stoga mogu biti opasni za ljudsko zdravlje.

Slika 2. Kemijske strukture (a) PCB-a (Faroon i Ruiz, 2016) (b) dioksina



(gore) i furana (dolje) (Kanan i Samara, 2018)

Figure 2. Chemical structures: (a) PCB-a (b) dioxins (up) and furans (down)

Glavni putovi izlaganja dioksinima i PCB-ima su koža, udisanje i gastrointestinalni trakt kod ljudi, a 90 % ljudske izloženosti je kroz gastrointestinalni trakt. PCB-ovi nastaju kloriranjem aromata (12–68 %), a neki su komercijalno poznat kao Aroclor, Phenoclor i Clophen. Poznato je 209 kongenera PCB-a, među kojima je šest PCB-a koji nisu slični dioksinima (PCB 180, -153, -138, -101, -52 i PCB-28) odabrani su kao pokazatelji PCB-a (unutar PCB-a) za praćenje ostataka u okolišu (voda, zrak i tlo) i u hrani (kao što su mliječni proizvodi, meso itd.). Danas se primjenjuju mnoge tehnike za otkrivanje PCB-a, dioksina i furana u prehrambenim proizvodima, kao što su plinska kromatografija uz detektor zahvata elektrona (GC-ECD), plinska kromatografija uz detektor spektrometrija mase (GC-MS), plinska kromatografija – trostruka kvadrupolna masena spektrometrija (GC QqQ-MS/MS) i plinska kromatografija spojena s masenim spektrometrom visoke rezolucije (GC-HRMS). Među njima, GC-QqQ-MS/MS ima visoku osjetljivost i visoku točnost i ima mnoge primjene u tom polju. Kiani i sur. (Kiani i sur., 2023) analizirali su PCB-e u uzorcima jogurta. Izvršena je priprema

uzoraka jogurta, QuEChERS modificiranom metodom. Modifikacija se sastoji u uvođenju koraka smrzavanja kako bi se odvojile masnoće te uvođenje dodanog otapala (primjerice toluen). Lorenzi i sur. (Lorenzi i sur., 2020) učinili su nekoliko eksperimenata kako bi istražili prijenos kontaminanata kao što su dioksini i furani (PCDDs, PCDFs). Ovaj rad opisuje istraživanje kontrolirane ishrane skupine krava u laktaciji, koje su hranjene ukupnom količinom miješanog obroka obogaćenog poznatom količinom 17 2,3,7,8-substituiranih dioksina i furana PCDD/F, 12 kongenera dioksinima sličnih-PCB (PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 i 189) i 6 PCB indikatora koji nisu slični dioksinu (NDL-PCB: PCB 28, 52, 101, 138, 153 i 180). Tako obogaćeni obrok se davao životinjama (faza izloženosti) dok nisu proizvele mlijeko koje premašuje maksimalno dozvoljenu koncentraciju ukupnog zbroja PCDD/F, DL-PCB i NDL-PCB-a. Potom su životinje primale ispravnu prehranu, a u uzorcima mlijeka koje su proizvodile pratilo se smanjenje kontaminanata (faza čišćenja). Za kvantitativno određivanje PCDD/F-ovi i PCB-i, uzorci mlijeka, slijepe probe kukuruznog ulja analizirani su plinskom kromatografijom visoke rezolucije u kombinaciji s masenom spektrometrijom visoke rezolucije (HRGC-HRMS). Priprema uzoraka uključivala je više postupaka. Prvi od njih je izdvajanje masti iz uzoraka mlijeka otapalom pod tlakom i povišenom temperatrom (eng. Accelerated Solvent Extractor, ASE). Slijedeći postupci uključivali su smrzavanje tijekom noći, otapanje u smjesi heksana i diklormetana te provođenje kroz dva koraka pročišćavanja od kojih jedan uključuje pročišćavanje na silika kolonama uz sumpornu kiselinu, a drugi sustav za pročišćavanje na kojem se frakcija PCB-a eluira kroz heksan/diklormertan smjesom do se frakcija dioksina eluira kroz ugljikovu kolou toluenom.

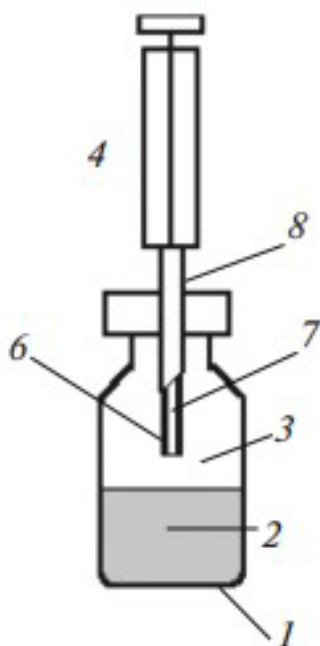
### Analiza okusa i mirisa

Zreli sir sadrži mnoštvo spojeva koji sudjeluju u formiranju okusa, a potječu iz postupka lipolize, reakcije oksidacije lipida i katabolizma ugljikohidrata, te proteolize koja daje i osnovne i pozadinske okuse.

Analiza prostora iznad otopine (eng. headspace) uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. Solid phase microextraction; SPME) prikazanu na slici 3 se pokazala najučinkovitija u analizi spojeva koji čine okus ili miris prehrambenog proizvoda. U HS-SPME analizi, analiti uspostavljaju ravnotežu između matrice uzorka, headspace prostora i stacionarne faze. Nakon ekstrakcije na vlakno koja se događa postizanjem analitičke ravnoteže, spojevi se termički desorbiraju s vlakna na kapilarnu GC kolonu. Obzirom da se ne koristi otapalo u ovoj vrsti pripreme i ekstrakcije uzoraka, analiti se brzo desorbiraju na kolonu uz minimalne granice detekcije te poboljšavaju rezoluciju. Spojevi odgovorni za okus hrane obično se identificiraju i kvantificiraju ekstrahiranjem iz matrice uzorka i propuštanjem kroz plinski kromatograf s detektorom masenog spektrometra (GC-MS). U SPME metodi, spojevi se adsorbiraju na stacionarnoj fazi koja je obložena vlaknom od taljenog silicijevog dioksida. Postoji više različitih vrsta vlakana. Razlikuju se prema sastavu adsorpcijskog filma.

Najviše najčešće korišteni filmovi vlakana su:

1. 100- $\mu$ m polidimetil siloksan (PDMS)
2. 65- $\mu$ m divinilbenzen (DVB)/PDMS
3. 75- $\mu$ m karboxen/PDMS
4. 85- $\mu$ m poliakrilat (PA)



Slika 3. SPME analiza: 1-ekstrakcijska bočica; 2-otopina uzorka; 3-plinovita faza uzorka; 4-SPME klip; 6-adsorpcijsko sredstvo na vlaknu; 7-cijevčica; 8-igla (Rodinkov, Bugaichenko, i Moskvina, 2020)

Figure 3. SPME analysis: 1- Extraction vessel, 2- liquid sample, 3- gas phase, 4- syringe, 6-adsorbing phase, 7- rod, 8- needle.

Vlakna su umetnuta u gornji prostor iznad uzorka, koji je ostavljen da se uravnoteži na 40–60 °C tijekom 15–30 min, a desorbira se 5–30 min. Tekućim uzorcima se često dodaju otopine soli ili same soli (NaCl ili Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) u svrhu smanjenja topljivosti hlapljivih spojeva i njihove adekvatnije ekstrakcije. Spojevi adsorbirani na vlakno zatim se toplinski desorbiraju, načešće 5 minuta u GC injektoru te zatim pod temperaturnim programom “putuju” kroz kolonu i detektor. Prema istraživanju Tunick i sur. (Tunick i sur., 2013), gotovo svi hlapljivi spojevi organski dobivenog mlijeka pokazali su viši relativni udio od konvencionalnih mliječnih spojeva, što ukazuje na to da je organsko mlijeko, koje daju krave s pašnjaka, ukusnije. Relativna zastupljenost heksanske, oktanske, nonanske i dekanske kiseline porasla je s vremenom pri 40 °C i bile su najviše nakon 90 min. Metil propionat (samo u konvencionalnom mlijeku) i 1-pentanol (samo u organskom mlijeku) mogu nastati uslijed aktivnosti mikroorganizama. Dimetil sulfid i dimetilsulfon potječu iz termičke razgradnje cisteina i metionina, a  $\alpha$ -Pinen koji je prisutan samo u organskom mlijeku, je terpenoid koji se nalazi u pašnjačkim biljkama. Mnogi spojevi prisutni u uzorcima mlijeka također su otkriveni u siru. Frank i suradnici (Frank i sur., 2004) pronašli su 45 hlapljivih spojeva u komercijalnim sirevima Cheddar i Queso Fresco. Spomenuti sirevi proizvode se bez bakterijske starter kulture, tako da sadrže manje spojeva okusa nego većina drugih sireva. Daleko više hlapljivih tvari prisutno je u sirevima intenzivnog okusa i mirisa kao što je Camembert. Pérès i suradnici (Pérès, Viallon, i Berdagué, 2001) detektirali su preko 70 spojeva u Camembertu nakon 10 minuta ekstrakcije na sobnoj temperaturi. Koncentracija kiselina i ketona može se povećati skladištenjem, kao i nonanala i dekana, koji se nastavljaju stvarati lipolizom dugolančanih masnih kiselina. Nasuprot tome, aldehidi se smanjuju na nemjerljive razine. Aldehidi kraćeg lanca su spojevi koji se u siru razlažu na alkohole. Furani kao što je furaneol, koji prema IUPAC nomenklaturi ima naziv 4-hidroksi-2,5-dimetil-3-furanona, nastaju u

mliječnim proizvodima od strane nekih laktobacila koji se mogu naći i u siru.

Masne kiseline su biomarkeri mikrobiološke aktivnosti. Nastaju (Székelyhidi i sur., 2020) tijekom razgradnje bakterija, laktoze, aminokiselina i kazeina te uslijed transformacija aminokiselina i pridonose značajno stvaranju hlapljivih aroma u sirevima. SPME tehnika također se može koristiti za određivanje profila masnih kiselina različitih namirnica. Primjerice, sireve i jogurte možemo okarakterizirati prema relativnoj koncentraciji masnih kiselina. Budući da prepoznatljiv okus u nemasnim sirevima osiguravaju masne kiseline s 4 do 8 ugljikovih atoma te octena kiselina u sličnim koncentracijama, analiza spektra masnih kiselina također je prikladna za detekciju krivotvorina sira (Székelyhidi i sur., 2020). Prisutnost aldehida i ketona u hrani općenito označava oksidaciju masnih kiselina ili aminokiselina, odnosno stvaranje metabolita uslijed bakterijske aktivnosti. Povećanje koncentracije aldehida je nepoželjno, jer ti spojevi imaju jaku aromu pa njihova prisutnost rezultira neugodnim okusom. S druge strane, aldehidi niske molekularne težine ( $\leq 100$  g/mol) proizvode ugodan organoleptički učinak u fermentiranim mliječnim proizvodima. DVB-CAR (divinilbenzen-karboksen) Ustanovljeno je da dolazi do povećanja koncentracije 2-heptanona i 2-nonanona 52 puta u pasteriziranom mlijeku u odnosu na sirovo mlijeko. Smanjenje koncentracije 2-butanona pokazuje da je mlijeko došlo do kraja roka upotrebe. Smanjenje koncentracije 2-butanona također je zabilježeno SPME analizom u procesu fermentacije jogurta te u proizvodnji sira. Esteri se uobičajeno analiziraju CAR-PDMS-SPME vlaknima. SPME se koristi za praćenje povećanja koncentracije etil acetata i metilnih estera jer su ti spojevi indikatori starenja mlijeka. Alkoholi su prisutni u većini mliječnih proizvoda. Određeni ravnolančani i metilirani alkoholi mogu se detektirati u neprerađenom mlijeku pomoću DVB-CAR-PDMS SPME vlakna. Etanol je obično najzastupljeniji alkohol u sirevima, iako su 1-feniletanol i 2-butanol prisutni u najvećim količinama u kozjim sirevima.

Mliječni proizvodi sadrže i sumporne organske spojeve koji nastaju tijekom toplinske obrade. Sumporni spojevi u mlijeku, kao što je dimetil sulfid, dolaze od termičke razgradnje koja uključuje sumporne aminokiseline. Tijekom analize proteina sirutke pomoću SPME tehnike otkriveni su sumporni spojevi nastali degradacijom (Leksrisompong i sur., 2010). U slučaju sireva, spojevi koji sadrže sumpor nastaju prvenstveno djelovanjem mikroorganizama, a ne zbog toplinske obrade. Analizom sadržaja sumpornih organskih spojeva korištenjem SPME omogućeno je otkrivanje nekoliko značajnih hlapljivih komponenti, primjerice anetiola, koji je odgovoran za karakterističan miris češnjaka u siru Camembert (Jaillais i sur., 1999) i kozjem siru (Delgado, i sur. 2011).

PDMS-CAR-DVB SPME vlakno koristi se za analizu furana, spojeva koji se mogu detektirati u dimljenim i duboko prženim sirevima.

Fenoli su aromatski spojevi u kojima je alkoholna hidroksilna skupina izravno vezana na benzenski prsten. Headspace analiza fenola je složen proces jer većina derivata fenola nisu hlapljivi zbog jake intermolekularne interakcije s matricom uzorka. Najčešće identificirani fenoli su različiti etil- i metilfenoli u sirevima od ovčjeg i kravljeg mlijeka. SPME analiza spojeva iz kemijske klase -terpenoidi može poslužiti za zaključivanje o vrsti hrane kojom su se životinje hranile te o geografskoj regiji iz koje je ta ista hrana potekla. Iako su terpeni biomarkeri i njihova analiza u mliječnim proizvodima je važna, njihova detekcija u uzorcima mlijeka korištenjem SPME tehnike je teška. Razlog za to je utjecaj matriksa, odnosno mliječne masti, i značajna različitost tlaka pare pojedinih terpena.

## TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

### *Analiza polifenola*

Pojava polifenola u mlijeku i mliječnim proizvodima povezana je s različitim čimbenicima, primjerice konzumacijom krmnog bilja, kataboličkom aktivnosti bakterija na proteine, ili njihovo namjerno dodavanje kao arome ili funkcionalnih sastojaka. (Cutrim i Cortez, 2018) Prethodnih godina razvijeno je nekoliko analitičkih metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva iz mlijeka, međutim, nema sveobuhvatne studije usmjerene na sveobuhvatno ispitivanje ovih spojeva u mlijeku i mliječnim proizvodima. Postoji nekoliko spektrofotometrijskih postupaka namijenjenih za kvantifikaciju fenolnih spojeva. Ovi postupci se temelje na različitim principima i koriste se za određivanje različite strukturne skupine prisutne u fenolnim spojevima. Još jedna metoda koja se može koristiti za određivanje polifenola je kolorimetrijski test temeljen na kompleksiranju fenolnih spojevi s Al (III). Spektrofotometrijske metodologije su manje korisne jer se dobiva samo procjena ukupnog broja polifenola. Kvantitativno mjerenje pojedinačnih spojeva se ne postiže. S druge strane, tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. high performance liquid chromatography; HPLC) je poželjna za odvajanje i kvantifikaciju polifenola u uzorku. Međutim, HPLC metode imaju ograničenja, osobito u složenim matricama kao što su uzorci hrane (Cutrim i Cortez, 2018). Posljedično, koraci koncentriranja i pročišćavanja fenola iz složene matrice je kritičan korak priprema uzorka. Tekućinska kromatografija uz detektor spektrometrije masa (LC-MS) trenutno je najbolji analitički pristup određivanju fenola iz različitih bioloških izvora i najučinkovitiji alat u proučavanju strukture polifenola. Prednosti MS-a su njegova visoka osjetljivost i znatna fleksibilnost u detekciji, kvantifikaciji i identifikaciji. Interakcije između različitih polifenola i sastavnica mlijeka mogu utjecati na bioaktivnost i bioraspoloživost ovih spojeva. Uočeno je da polifenoli čaja uglavnom međusobno djeluju s kompleksom  $\alpha$ -kazeina i topivim  $\beta$ -kazeinom rezultirajući kazein-polifenol kompleksima. Također je potvrđeno da u nedostatku kazeina, proteini sirutke  $\alpha$ -laktalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina mogu stupiti u interakciju s polifenolima, što rezultira topljivim ili netopljivim protein-polifenol kompleksima, ovisno o udjelima proteina i polifenola u smjesi. (Cutrim i Cortez, 2018)

Rocchetti i suradnici (Rocchetti i sur., 2022) analizirali su polifenolne spojeve u kravljem mlijeku uslijed različitih tretmana prehrane životinja. Koristili su tehniku tekućinske kromatografije vrlo visoke djelotvornosti (eng. ultra high liquid chromatography, UHPLC) uz masenu spektrometriju visoke rezolucije (eng. high resolution mass spectrometry, HRMS) kao detektor. U svom radu identificirali su 70 spojeva koji pripadaju skupini fenolnih spojeva i strukturno su dokazani MS/MS tehnikom. Prema njihovim rezultatima, najzastupljeniji su spojevi: hipurinska kiselina, hidroksikafeinska kiselina i 7-hidroksikumarin. (Rocchetti i sur., 2022).

Rashidinejad i suradnici (Rashidinejad i sur., 2016) ispitali su moguću interakciju između katehina iz zelenog čaja i globula mliječne masti. Zaključeno je da postoje veze između kuglica mliječne masti i polifenola zelenog čaja zbog prisutnosti i hidrofobnih te hidrofilnih dijelova.

### *Analiza pesticida i veterinarskih lijekova*

Pesticidi se analiziraju tekućinskom kromatografijom prema sličnim principima i legislativama kao i plinskom kromatografijom, pripremom uzorka QUECHERS metodom. Također vrijedi da je najučinkovitiji pristup analizi pesticida je MRM metoda kojom se može analizirati širok spektar pesticida te se maksimalno dozvoljene granice pretražuju unutar Uredbe 396/2005, a kriteriji za validacijske parametre unutar trenutno važećeg SANTE dokumenta. Razlike između ovih tehnika su u vrsti pesticida koji se mogu analizirati. Generalno, tekućinskom kromatografijom analiziraju se polarniji pesticidi, s većom konstantom topljivosti u vodi. Različitost između analiza ovim tehnikama je sadržana i u utjecaju matriksa. Svi tipovi uzoraka mliječnih proizvoda neovisno

o udjelu masti se mogu analizirati tekućinskom kromatografijom uz detektor dvostruke spektrometrije masa. Organofosfori (OP) pesticidi su oni koji se dobivaju iz fosforne, fosfonske i tiofosforne kiseline. Bez obzira što su manje postojani spojevi u okolišu u usporedbi s organoklorinim pesticidima, nekoliko je autora izvijestilo o prisutnosti ostataka OP uključujući malation, klorpirifos, diklorvos, profenofos, kumafos, metamidofos, etion i dimetoat u mlijeku. Mogu bioakumulirati u ljudskim organima. Piretroidi su sintetski organski insekticidi dobiveni iz prirodnih cvjetova buhača (*Chrysanthemum Coccineum* i *Chrysanthemum cinerariae folium*). Oni se koriste diljem svijeta od 1980. godine i smatraju se najsigurnijim za korištenje u hrani zbog njihove fotodegradacije, učinkovitosti protiv raznih insekata, te niske toksičnosti u usporedbi s drugim pesticidima kao što su organoklorini, organofosfori ili karbamati. Međutim, unatoč niskoj toksičnosti i visokoj razini učinkovitosti protiv ciljnih organizama, prenatalna izloženost piretroidnim pesticidima i njihovim metabolitima može biti povezana s različitim bihevioralnim problemima ili funkcioniranjem organizma. Cihalotrin, bifentrin, deltametrin, cipermetrin su piretroidi detektirani najčešće u uzorcima kravljeg mlijeka u Pakistanu ili Indiji (Boudebouz i sur., 2022). Karbaril, aldikarb i karbofuran su pesticidi iz skupine karbamata koji se također analiziraju LC-MS/MS tehnikom. Po strukturi i namjeni slični su OP pesticidima. Obilno se koriste karbamatni insekticidi u domaćinstvima i za poljoprivredne svrhe. Sulfonamidi, tetraciklini i fluorokinoloni su skupine sintetskih antibakterijskih sredstava široko korištenih u veterinarskoj praksi za liječenje i prevenciju infekcija u životinje za proizvodnju hrane. Ove tri skupine antibiotika najčešće se koriste za terapijsku svrhu u veterinarskoj praksi zbog niske cijene, lake dostupnosti bez recepta i širokog spektra djelovanja (Moudgil, Bedi, Aulakh, Gill, i Kumar, 2019). EU je uspostavio MRL od 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  za sulfonamide, tetracikline i fluorokinolona u hrani i namirnicama životinjskog podrijetla. Kloramfenikol je učinkovito terapijsko sredstvo za liječenje mastitisa kod goveda zbog svoje široke aktivnosti spektra, visoke učinkovitosti i niske cijene. Međutim, radi potencijalnog rizika kancerogenosti i sumnje na aplastičnu anemiju ljudi uzrokovanu njegovim ostacima u hrani, u mnogim zemljama kloramfenikol se pokušava zabraniti kod životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Moudgil i sur. (2019) su koristili su različita ekstrakcijska otapala i pufere za ekstrakciju antibiotika iz mlijeka, kao što je fosfatni pufer (pH 7), fosfat-citrat-EDTA pufer (pH 7) i natrijev EDTA-McIlvaine pufer pri pH 4 i 7. Potonji je se pokazao kao najučinkovitiji zbog istodobne ekstrakcije svih ciljanih tvari, antibiotika iz mlijeka, s dobrim iskorištenjima. Ekstrakti dobiveni nakon taloženja proteina i ekstrakcije pročišćeni su pomoću polimernih HLB kolona (eng. solid phase extraction cartridge; SPE cartridge). Različiti istraživači izvijestili su o višim vrijednostima iskorištenja korištenjem polimernih HLB kolona za pročišćavanje ekstrakata. S prethodnim studijama Mamanija i suradnika također se slažu veće vrijednosti iskorištenja za tri različite skupine antibiotika (sulfonamidi, tetraciklini i kloramfenikol) dobivene pomoću Oasis HLB kolona i niže interferencije svakog analita.

### *Analiza bisfenola A*

Bisfenol A (BPA), koji posjeduje aktivnost sličnu estrogenim steroidima je industrijska kemikalija, široko korištena u proizvodnji polikarbonatne plastike, epoksidne smole i kao stabilizator. Polikarbonatna plastika se obično koristi u ambalažama za hranu i piće; smole se koriste kao obloge za premazivanje metalnih proizvoda kao što su limenke hrane, čepovi boca i posude za mlijeko. Zabilježena je migracija BPA iz površine PVC proizvoda u hranu. (Krivohlavek i sur., 2023). Tehnike pripreme uzoraka koje se trenutno koriste za praćenje prisutnosti ovih spojeva u mlijeku su mnoge i različite. Temelje se na ekstrakciji na polimerima, ali najčešće korištena je ekstrakcija otapalom uz pročišćavanje na C18 koloni. Iako se SPE smatra zlatnim standardom tehnike pripreme uzoraka za analizu mlijeka, zahtijeva ukljanjanje masnoća i precipitaciju proteina mlijeka prije ekstrakcije kako bi se smanjio rizik da se pore u SPE koloni začepi. FPSE (eng. Fabric phase sorptive extraction) (Mesa,

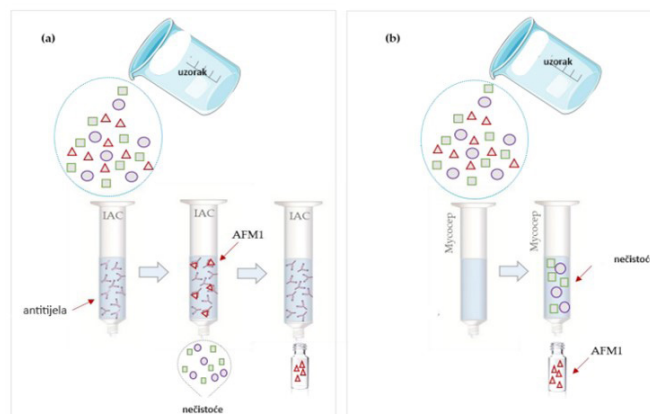


Kabir, Samanidou, i Furton, 2019) ima jedinstvenu kombinaciju SPE i SPME u jednoj tehnici pripreme uzorka. Koristi se komad prirodne ili sintetičke tkanine (celuloza/polijester/staklena vlakna) kao supstrat za stvaranje tankog filma na svojoj površini koji se kemijski veže za podlogu. FPSE medij je vrlo porozan i može se unijeti izravno u spremnik za uzorkovanje za ekstrakciju analita. Magnetska miješalica se može koristiti za brže povezivanje analita iz otopine u FPSE medij, što rezultira bržim prijenosom mase i kraćom ekstrakcijom, odnosno kraće je vrijeme potrebno za uspostavu ravnoteže. Na kraju ekstrakcije, FPSE medij je izložen malom volumenu organskog otapala (500  $\mu\text{L}$ ) za eluiranje ekstrahiranih analita u njega. Ako su molekule masti ili proteina fizički su pričvršćene na FPSE medij, one se talože tijekom povratne ekstrakcije otapalom. Na kraju, otopina se može centrifugirati kako bi se uklonile sve čestice prisutane u otopini i naknadno se ubrizgava u kromatografski HPLC sustav.

Prema Pravilniku o maksimalnim koncentracijama određenih kontaminanata u hrani, Bisfenol A (BPA) pripada kontaminantima čija prisutnost u hrani mora biti kontrolirana. Europska komisija je postavila specifične maksimalne dopuštene razine BPA u raznim prehrambenim proizvodima, uključujući mliječne proizvode, kako bi zaštitila zdravlje potrošača. Ove granice su definirane u europskoj legislativi, koja je implementirana i u Hrvatskoj. Maksimalno dopuštena koncentracija BPA u hrani općenito je postavljena na 0.05 mg/kg hrane, uključujući mliječne proizvode prema Europskoj Direktivi EU 2018/213.

### Analiza aflatoksina

Aflatoksini (AF) smatraju se najotrovnijim metabolitom koje proizvode plijesni, poput *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* i rijetko *Aspergillus nomius*. Glavni su aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1) i aflatoksin G2 (AFG2). Europska unija ima najstrože zakone po pitanju maksimalnih dopuštenih koncentracija u proizvodima od mlijeka, 0,05  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za odraslu osobu; odnosno 0,025  $\mu\text{g kg}^{-1}$  za djecu i dojenčad. Za analizu aflatoksina u mlijeku potrebno je prije svega osigurati reprezentativan i homogen uzorak što uzorkovanje čini vrlo bitnim korakom. Prilikom uzorkovanja, uzima se više pod-uzoraka iz različitih proizvoda ili spremnika. Uredba Europske komisije 401/2006 ('Regulation - 401/2006 - EN - EUR-Lex', ) propisuje metode uzorkovanja i analizu za službenu kontrolu razine aflatoksina M1 u mlijeku. Prije same analize potrebno je ukloniti masti i proteine iz mlijeka centrifugiranjem ili filtracijom. Ekstrakcija M1 iz sira općenito se provodi pomoću organskih otapala, kao što je smjesa acetonitril-voda ili smjesa metanol-voda. Ekstrakcija čvrstim sorbentima (kao što je ekstrakcija čvrstom fazom (SPE), ekstrakcija magnetskom čvrstom fazom (MSPE), ili QuEChERS su alternativne metode pripreme uzorka za analizu mikotoksina (Vaz i sur., 2020). Obično se nakon ekstrakcije primjenjuje čišćenje kako bi se dobili točniji i precizniji rezultati, ali nije uvijek potrebno. SPE priprema uzorka omogućuje ekstrakciju i pročišćavanje analita prije instrumentalne analize. Polimeri s molekularnim utiskom (eng. magentic imprint polymer, MIP) su sintetski materijali s mjestima prepoznavanja koja specifično vežu ciljne molekule u smjesama s drugim spojevima. Ovaj proces je brz, troši manje otapala i omogućuje selektivno čišćenje analita. MIP su, za razliku od klasičnih SPE sorbenata, selektivniji i omogućuju eluiranje analita iz kolonice, gotovo bez koekstrahiranih spojeva. Trenutno, najčešće korištene metode pročišćavanja koriste imunoafinitetne kolone (eng. immunoaffinity cartridge, IAC) ili višenamjensko čišćenje u jednom koraku (MycosepTM) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz pripreme uzorka (a) imunoafinitetnim kolonama IAC (b) Mycosep (Vaz i sur., 2020)

Figure 4. Sheme of: (a) immunoaffinity column IAC (b) Mycosep

Ove tehnike pružaju nekoliko prednosti. Jedan primjer je analiza uzorka mlijeka, nakon prethodne obrade uklanjanja masnoća, bez koraka ekstrakcije, izravno nanošenje u IAC kolone. Međutim, u slučaju viskoznih ili čvrstih uzoraka (sir) uvijek jest potrebno imati korak ekstrakcije. Imunoafinitetne kolone vrlo su učinkovite tehnika pročišćavanja: temelje se na prepoznavanju toksina pomoću specifičnog antitijela. Iako su IAC jednostavni za korištenje i imaju visoku selektivnost, oni su za jednokratnu upotrebu zbog denaturacije antitijela tijekom koraka elucije, što čini troškove pripreme uzorka visokim. Višenamjenske kolone za čišćenje MycosepTM sastoje se od brojnih adsorbenata (ugljen, celit, ionsko-izmjenjivačke smole i drugo) pakiranih u plastičnu tubu. Kolone MycosepTM učinkovito uklanjaju komponente matrice i mogu proizvesti pročišćeni ekstrakt u kratkom vremenu, pročišćavanje uzorka se postiže za 10 do 30 s (Vaz i sur., 2020). Ovo brzo i učinkovito pročišćavanje nadilazi i predstavlja alternativu konvencionalnim SPE ili IAC metodama, koje obično zahtijevaju tri do četiri koraka. Nakon ekstrakcije i pročišćavanja potrebna je kvantifikacija analita u uzorku. Tijekom proteklog desetljeća korišteno je ili razvijeno nekoliko metoda za kvantifikaciju M1 u mliječnim proizvodima. Tekućinska kromatografija (LC) je metoda koja pruža dobru osjetljivost, široki dinamički raspon i svestranost. Detekcija pomoću LC-a obično se provodi fluorescentnom detekcijom (FLD), UV apsorpcijom ili masenom spektrometrijom. Međutim, većina trenutnih metoda koristi HPLC reverznih faza, s mješavinama metanola, vode i acetonitrila kao pokretnim fazama. Reverzno-fazni eluensi gase fluorescenciju mikotoksina poput AFM1; iz tog razloga može biti potrebna kemijska derivatizacija, koristeći derivatizaciju prije ili poslije kromatografskog odvajanja. Derivatizacija prije kolone koristi trifluoroctenu kiselinu (TFA) za formiranje odgovarajućih hemiacetala, dok derivatizacija poslije kolone koristi halogen poput joda ili broma. Maseni spektrometar najčešće se koristi zbog mogućnosti generiranja karakterističnog spektra prilikom fragmentacije. Može se koristiti: jedinični kvadrupol MS, trostruki kvadrupol (MS/MS) i linearna ionska zamka (MSn). Instrumenti s detektorom ionske zamke su bolji za identifikaciju od trostrukih kvadrupol instrumenata (veća MSn moć) (Vaz i sur., 2020).

### Analiza mikronutrienata

Vitamini se mogu klasificirati na temelju njihove topljivosti u vodi. Vitamini topljivi u vodi su skupina B (tiamin, riboflavin, niacin, biotin, pantotemat, folat, piridoksin, vitamin B6) te kobalamin (i njegovi derivati, vitamin B12) i askorbinska kiselina (vitamin C), dok vitamini topivi u mastima su retinol (vitamin A), kalciferoli (vitamin D), tokoferoli (i srodni spojevi, vitamin E) i filokinon (i srodni spojevi, vitamin K). U industrijaliziranim zemljama mliječni proizvodi se ističu kao izvor kalcija, ali on doprinosi i s 20–40% unosu vitamina A, B2, B12 i K kao i fosfora, magnezija, cinka i joda (Melse-Boonstra, 2020).

Većina analiza vitamina A provedena je korištenjem HPLC-a uz UV, fluorescenciju i MS detekciju ili LC-MS/MS. HPLC je dominantna tehnika za vitamin A analizu i omogućuje kromatografsko odvajanje i brzu analiza različitih oblika vitamina A kao i separaciju od sastojaka matrice.

Taloženje proteina provedeno je etanolom ili metanolom, saponifikacijom prije ili nakon postupka ekstrakcije uz korištenje otapala kao što su heksan, petrol eter ili dietil eter.

Kalijev hidroksid često se koristi za saponifikaciju, a enzimski hidroliza se može koristiti kao prethodna obrada koraka saponifikacije za oslobađanje retinola i karotenoida (Hampel, Dror, i Allen, 2018).

Riboflavin (7,8-dimetil-10-ribitil-izaloksazin) i njegov koenzimski oblik flavin adenin dinukleotid FAD su prevladavajući oblici vitamina B2 u mlijeku i mliječnim proizvodima. U mliječnim proizvodima, riboflavin je većinom nekovalentno vezan za proteine, pretežno kao FAD i manjim dijelom kao flavin mononukleotid (FMN). Mlijeko sadrži slobodni riboflavin vezan na specifične proteine.

HPLC odvajanje praćeno fluorescentnom detekcijom je uobičajena tehnika za analizu riboflavina u mlijeku. Međutim, dobivene vrijednosti moraju biti ispravljene za stvaranje FAD oblika uzrokovano stvaranjem intramolekularnog kompleksa, koji bi mogao biti zanemaren u izvješćima prije 1990. Alternativno, FAD se može kvantitativno pretvoriti u riboflavin pomoću enzimske obrade prije fluorometrijske analize. U novije vrijeme analiza riboflavina i FAD oblika vrši se putem UPLC-MS/MS tehnike omogućujući analizu vitamina B-2 njihovim izvornim oblicima.

Vitamin B12 je skupni naziv za B vitamine koji sadrže kobalt. Mlijeko sadrži 0,40–0,45 µg vitamina B12 na 100 ml, dok sir može sadržavati do 2 µg na 100 g (Melse-Boonstra, 2020).

Derivati vitamina B12 u mlijeku su hidroksikobalamin, adenosilkobalamin, i metilkobalamin, a uglavnom je vezan za proteine haptokorin, transkobalamin i kazein.

Vitamin K2, prvenstveno sintetiziraju bakterije i fermentirani mliječni proizvodi kao što su jogurt i sir su dobri izvori ovog vitamina. Vitamin K je vitamin topiv u mastima, i kao takav se apsorbira putem lipidnog puta. Mlijeko sadrži 0,7–1,4 µg menakinona na 100 ml, dok punomasni tvrdi sir može sadržavati do 68 µg na 100 g.

Dva reda veličine veća osjetljivost može postići korištenjem FLD i ECD detektora u usporedbi s UV detekcijom; međutim, oba zahtijevaju derivatizaciju K vitamina u njihov reducirani oblik za detekciju. Derivatizacija se može se postići kemijski, elektrokemijski, fotokemijski, katalitičkom redukcijom na čvrstoj fazi nakon kolone korištenjem cinka, platininog oksida ili platine. LC-MS/MS je također opisan za analizu vitamina K. Uzorci se podvrgavaju tretmanu lipazom, taloženju proteina i ekstrakciji heksanom.

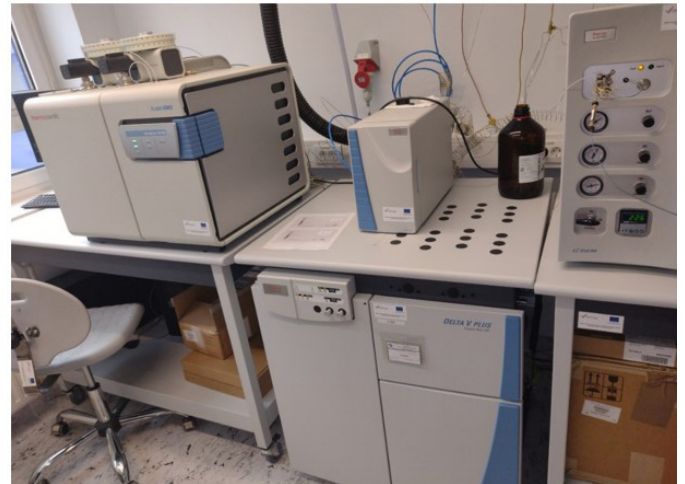
## ANALIZA IZOTOPNOG SASTAVA

Analiza omjera stabilnih izotopa (eng stable isotope ratio analysis, SIRA) je analitička metoda koja ispunjava sve kriterije potrebne za zemljopisnu provjeru autentičnosti raznih prehrambenih proizvoda uključujući vino (Christoph i sur., 2015) meso (Bontempo i sur., 2023), mlijeko i mliječne proizvode (Gregorčić i sur., 2021). Da bi se uspostavio izotopski profil, ili autentičnost uzorka općenito, potrebno je odrediti (izmjeriti) omjere stabilnih izotopa elemenata kao što su 2H/1H, 13C/12C, 15N/14N i 18O/16O. Zastupljenost ovih izotopnih elemenata fiksirana je kada je planet Zemlja formirana na globalnoj razini te se od tada njihov sastav, odnosno omjer, nije promijenio. Do suptilnih varijacija u izotopskom sastavu materijala može doći tijekom bioloških, kemijskih i fizikalnih procesa. IRMS (eng. isotope ratio mass spectrometry) je tehnika koja se koristi za mjerenje relativne zastupljenosti izotopa u različitim materijalima. Razlike u prirodnoj zastupljenosti izotopa izražava se kroz veličinu  $\delta$  prema slijedećim jednadžbama:

gdje je R relativna zastupljenost.

$$\text{omjer } R = \frac{\text{zastupljenost te\u017eeg izotopa}}{\text{zastupljenost lak\u0161eg izotopa}}$$

$$\delta = \left( \frac{R_{\text{uzorka}}}{R_{\text{std}}} - 1 \right)$$



spectrometry), Thermo Scientific (vlastita fotografija)

Figure 5. LC-IRMS instrument (Liquid chromatography isotope ratio mass spectrometry), Thermo Scientific

Izotopske varijacije nalaze se u velikom broju materijala, a izotopski profil je jedinstven za porijeklo i povijest tvari. IRMS stoga ima širok raspon primjena. IRMS instrumenti posebno su dizajnirani za precizno mjerenje malih razlika u zastupljenosti izotopa kao što su 2H/1H, 13C/12C, 15N/14N i 18O/16O. Prije analize IRMS-om, uzorci se pretvaraju u jednostavne plinove kao što su H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> i CO, ovisno o sastavu materijala i izotopima od interesa. IRMS mjeri omjer iona koji odgovaraju tim plinovima. Na primjer, u analizi omjera izotopa ugljika, maseni spektrometar prati ione s omjerima mase i naboja (m/z) 44, 45 i 46 koji odgovaraju ionima proizvedenim iz molekula CO<sub>2</sub> koje sadrže 12C, 13C, 16O, 17O i 18O u raznim kombinacijama. Omjeri izotopa koji su prirodno zastupljeni, mjere se u odnosu na međunarodne standarde (primarni materijali) koji definiraju mjernu ljestvicu za pojedine isotope. Za mjerenje izotopnih omjera nepoznatih uzoraka koji se ispituju preduvjet je koristiti dobro karakterizirane standarde (radni plin i/ili čvrsti materijal) čiji omjeri izotopa su utvrđeni u odnosu na primarne materijale. Najčešći standardi koji se koriste su kazein i urea.

Sullivan i sur 2022. godine (O'Sullivan i sur., 2023) usporedili su različite metode za izolaciju kazeina iz mliječnih proizvoda kako bi potom mjerenjem izotopnog sastava frakcije kazeina pridonijeli određivanju geografskog porijekla. Prednost korištenja specifične frakcije, kao što je kazein, za usporedbu izotopnog sastava različitih proizvoda, različito zemljopisnog podrijetla ili sustava proizvodnje, je da se eliminira doprinos drugih frakcija varijacijama omjera stabilnih izotopa između proizvoda. Primjerice, izotopske vrijednosti proteinske i lipidne frakcije značajno se razlikuju, stoga razlike u izotopskim vrijednostima punomasnih mliječnih proizvoda mogle bi postojati zbog razlika u koncentraciji lipida između proizvoda nasuprot faktorima kao što su geografsko podrijetlo ili proizvodni parametri. Druga prednost korištenja proteinske frakcije kao što je kazein je da je zbog svog elementarnog sastava moguće mjeriti izotopske vrijednosti svih lakih elemenata (H, C, N, O, S); što nije slučaj s lipidnim frakcijama, u kojima su vrijednosti izotopa N i S ograničene. Godine 2023. Sullivan i suradnici pripremili su međunarodni set uzoraka tri vrste mliječnih proizvoda (maslac, tvrdi sir i punomasno mlijeko u



prahu) te izolirali kazein kako bi mjerili izotopni sastav ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$  ili  $\delta^{34}\text{S}$ ). Prema njihovim rezultatima,  $\delta^{13}\text{C}$  vrijednosti mlijeka različite su za različite regije ovisno o prehrani životinja. U ovoj studiji, vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  bile su negativnije u irskim, novozelandskim i australskim mliječnim proizvodima usljed više C3 biljne prehrane za životinje koje proizvode mlijeko ovih regija. To je također, skladu sa sustavom proizvodnje mlijeka na pašnjacima u spomenutim zemljama i njihovih klimatskih uvjeta. Nasuprot tome,  $\delta^{13}\text{C}$  vrijednosti su bile najmanje negativne u kineskim i američkim mliječnim proizvodima sugerirajući više C4 biljne prehrane za životinje koje daju mlijeko, u skladu s proizvodnjom mlijeka na bazi koncentrata (zrna kukuruza).

$\delta^{15}\text{N}$  vrijednosti su također povezane s prehranom životinje koja proizvodi mlijeko i odražavaju izvor N iz biljke koja čini prehranu. Na vrijednosti izotopa dušika u tlu utječu poljoprivredni postupci kao što je primjena gnojiva. Vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  bile su visoke za irske i australske uzorke, što ukazuje na sustav proizvodnje mlijeka na pašnjacima u tim zemljama. Rezultati  $\delta^{13}\text{C}$ , koji su pokazali isto. Vrijednosti  $\delta^{34}\text{S}$  odražavaju geologiju regije (Chivas i sur., 1991), a također su pod utjecajem efekta „prskanja mora“ koji dovodi do obogaćene vrijednosti tla u blizini obale izotopima sumpora. Postojanje i značajan opseg ovog učinka „prskanja mora“ dokumentirali su (Zazzo i sur., 2011) koji je pokazao da su obalne vrijednosti  $\delta^{34}\text{S}$  ovčje vune u Irskoj bile mnogo više bliže obali i postupno su se smanjivale dalje u unutrašnjost (>100 km). U studiji Sullivana i suradnika, uzorci iz unutrašnjosti Europe i SAD-a imale su niže vrijednosti  $\delta^{34}\text{S}$  u usporedbi s otočnim zemljama i onima s velikom obalom kao što su Irska i Novi Zeland što ukazuje na kontinentalni naspram pomorski učinak na vrijednostima  $\delta^{34}\text{S}$  u uzorcima mlijeka u skladu s prethodnim studijama. Općenito, kada su vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  bile veće, vrijednosti  $\delta^2\text{H}$  također su bile manje negativne. Vrijednosti  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  mlijeka variraju ovisno o izvoru vode životinje.  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  vrijednosti mogu biti i pod utjecajem sezone, odnosno udjelu padalina u vrijeme proizvodnje mlijeka, zemljopisne širine, nadmorske visine.

Prema nekim radovima, utjecaj godišnjeg doba je veći nego utjecaj geografske širine.  $\delta^{18}\text{O}$  i  $\delta^2\text{H}$  vrijednosti su više negativne zimi i manje negativne ljeti (Abeni i sur., 2015) što može bitno prikriva učinak zemljopisne širine.

Perini i sur. (2022) istraživali su korištenje  $\delta^2\text{H}$  vrijednosti laktoze i  $\delta^{18}\text{O}$  vrijednosti mlijeka kao geografski pokazatelj mlijeka u Europi. Ovaj je rad pružio dokaze o potrebi izdvajanja određene komponente ili frakcije iz proizvoda kako bi se usporedili različiti mliječni proizvodi. Ako je više elemenata i više proizvoda, ili sastava proizvoda, moguća je primjena multivarijantnih statističkih pristupa.

Potočnik i suradnici (2020) usporedili su rezultate izotopnog sastava ( $\delta^2\text{H}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$  kazeinskog ekstrakta mlijeka) i elementne analize (Ca, K, Cl, S, P, Zn, Br, Rb, Sr, Mn, Fe, Cu, Se, As, Cd, Pb) na uzorcima mlijeka proizvedenih u Sloveniji od 2012. do 2014. godine s ciljem stvaranja baze podataka autentičnih slovenskih mlijeka kako bi se potom svaki uzorak mogao klasificirati prema godini, godišnjem dobu i načinu proizvodnje. Rezultati su pokazala da tri slovenska mlijeka kupljena na tržnici nisu zadovoljili postavljene kriterije prihvatljivosti, što ukazuje na moguće pogrešno označavanje proizvoda. Informacije dostupne kroz ovu studiju mogu se koristiti kako bi se povećala transparentnost u opskrbnom lancu mlijeka i mliječnih proizvoda. Nadalje, uspostavljeni sustav primjenjiv je i na druge zemlje i uzorke mliječnih proizvoda.

## ATOMSKA SPEKTROSKOPIJA

Elementi se mogu podijeliti prema zastupljenosti, (koncentracije > 100 mg/g ; između 0,1 mg/g i 100 mg/g ; koncentracije < 0,1 mg/g). Osim toga, elementi se mogu klasificirati kao mineralne tvari i toksične tvari. Mineralne tvari su neophodne za ljudski rast i razvoj. Koncentracije mineralnih tvari u mlijeku su ovisne o hranidbi, pasmini, životinjskoj vrsti, stupnju laktacije, godišnjem dobu, okolišnim uvjetima, lokalitetu i zdravlju vimena. Osim toga, postoje razlike u koncentracijama elemenata

različitih vrsta mlijeka.

Znanstvenici analiziraju koncentracije toksičnih tvari u mlijeku i vrše procjene rizika.

Za određivanje elemenata korištene su različite tehnike u mlijeku i proizvodima na bazi mlijeka, kao što su plamena i grafitna atomska apsorpcijska spektrometrija (FAAS i GFAAS), atomska fluorescentna spektrometrija (AFS), induktivno spregnuta plazma s optičkom emisijskom spektrometrijom (ICP-OES), i induktivno spregnuta plazma uz spektrometriju masa (ICP-MS). Hidridna tehnika (MHS) tehnika koristi se za određivanje žive, arsena i selen. Živa se se reducira u elementarni oblik pomoću natrij borhidrida. Elementarna živa u struji argona transportira se u kvarcnu kivetu zagrijanu na 100 °C. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 253,7 nm. Arsen i selen reduciraju se natrij borhidridom, transportiraju se u kvarcnu kivetu zagrijanu na 900 °C gdje dolazi do atomizacije.

Kod plamene fotometrije (PAAS tehnike), zakiseljeni uzorci se izravno aspiriraju u plamen apsorpcijskog spektrofotometra. Otapalo ispari u osnovnom području plamena. Molekulski aerosol ulazi u najtopliji dio plamena gdje nastaju plinoviti atomi. Kada zraka svjetlosti prolazi kroz oblak slobodnih atoma u plamenu dolazi do apsorpcije svjetla odabranog elementa.

ICP-MS je visokoosjetljiva tehnika gdje je moguća multielementna analiza. Uzorci u plazmu unose se pomoću protoka argona kroz središnju kvarcnu cijev. Uzorak se unosi u obliku aerosola koji nastaje raspršivanjem tekućih uzoraka u raspršivaču. U plazmi se otopljeni uzorci pretvaraju u paru (atomizacija je gotovo potpuna) i prisutni sastojci razlažu se na sastavne atome i ioniziraju. U masenom spektrometru ioni su razdvojeni i elementi identificirani prema odnosu masa/naboj (m/z) dok je koncentracija elemenata proporcionalna broju iona.

Identifikacija se provodi mjerenjem apsorbcije na točno određenoj valnoj duljini koja je karakteristična za traženi analit. Kvantifikacija se provodi usporedbom dobivene apsorbcije u uzorku s apsorbcijom dobivene u prethodno izrađenom kalibracijskom pravcu koristeći otopine certificiranog referentnog materijala.

Metode temeljene na ovim tehnikama ispunjavaju zahtjeve više pravilnika i uredbi po pitanju granice detekcije (LOD. limit of detection) i granice kvantifikacije (LOQ. Limit of quantification). Radi se o slijedećim dokumentima:

Uredba Komisije (EZ) br. 333/2007 od 28. ožujka 2007. o metodama uzorkovanja i analitičkim metodama za službenu kontrolu razina olova, kadmija, žive, anorganskog kositra, 3-MCPD-a i benzo (a)pirena u hrani Uredba komisije (EU) 2016/582 od 15.04.2016. o izmjeni Uredbe (EZ) br.333/2007 u pogledu analize anorganskog arsena, olova i policikličkih aromatskih ugljikovodika li određenih izvedbenih kriterija za analizu ('Uredba - 2016/582 - EN - EUR-Lex', )

U usporedbi s ICP-MS-om, ICP-OES ima nižu osjetljivost; stoga je teže analizirati elemente u tragovima kao što su Cd i As (Chen, Li, Li, i Deng, 2020). ICP-MS ima nekoliko prednosti, kao što su velika brzina skeniranja, kratko vrijeme rada, visoka osjetljivost, niska granica detekcije i široki linearni raspon. Kao rezultat toga, ICP-MS se široko koristi za analizu elemenata u tragovima u hrani. Najveće koncentracije kalija utvrđene su u kozjem mlijeku, a značajno niže koncentracije K dobivene su u bivoljem mlijeku. Kalcij ima uloge u mineralizaciji kostiju i zuba te u nizu fizioloških i biokemijskih reakcije u ljudskom tijelu. Mlijeko je važan izvor kalcija. Koncentracija Ca najveća je prema istoj studiji u u devinom mlijeku, a slijedi ga mlijeko jaka i bivolje mlijeko. Pb, Cr, As i Cd su otrovniotoga je potrebno pažljivo pratiti njihove koncentracije u hrani.

## ZAKLJUČAK

Analiza mliječnog proizvoda uključuje tri jednostavne radnje, prikupljanje reprezentativnog uzorka, pripremu uzorka i na kraju analizu korištenjem odgovarajućih metoda i opreme. Analitički rezultati nikada nisu pouzdaniji od tehnike uzorkovanja i premda ove aktivnosti su neovisne jedna o drugoj, mogu imati značajan utjecaj jedna na drugu. Moderna prerada mlijeka doživjela je značajan napredak opreme i raznih tehnika za razvoj proizvoda na najučinkovitiji i održiv način s velikim naglaskom na smanjenje energije i otpada. Osim napretka u mljekarstvu, inovativne analitičke tehnike ispitivanja i brze metode analize, utrli su put proizvođačima mliječnih proizvoda za sigurnu proizvodnju, visokokvalitetnih prehrambenih proizvoda. Kako bi se osigurao visok prinos i iznimna kvaliteta moraju se uspostaviti sustavi kvalitete u svakoj prehrambenoj industriji od sirovina do gotovog proizvoda, putem optimiziranih sustava kvalitete. To se postiže analitičkim ispitivanjem i strategijom uzorkovanja koje su vođene zakonodavnim i regulatornim smjericama i standardima, a koje također pokreću zahtjevi potrošača. Imperativ svakog sustava kvalitete je laboratorijska kvaliteta standardima i metodama, prema zahtjevima kupaca i regulatornim zahtjevima. Analitički alati za istraživanje hrane se neprestano se razvijaju kako bi se omogućila brža, osjetljivija analiza. Korištenje spektroskopskih metoda je učinkovito u ocjenjivanju svojstava kvalitete u mliječnim proizvodima. Većinu standardnih metoda razvila su nacionalna tijela za normizaciju preko ISO-a (eng. International Standards Organisation). Alternativne metode analize umjesto standardnih metoda se mogu koristiti, ali moraju biti potvrđene od strane akreditiranih organizacija kao što su AOAC International (Udruga službenih poljoprivrednih kemičara) te metoda mora biti validirana.

## Literatura

- Abeni F., Petrera F., Capelletti M., Prà A.D., Bontempo L., Tonon A., Camin F. (2015) Hydrogen and oxygen stable isotope fractionation in body fluid compartments of dairy cattle according to season, farm, breed, and reproductive stage. *PLoS ONE*, 10 (5).
- Ahmad W., Al-Sibaai A.A., Bashammakh A.S., Alwael H., El-Shahawi M.S. (2015) Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 72, 181–192.
- Alves S.P., Bessa R.J.B. (2009) Comparison of two gas-liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat. *Journal of Chromatography A*, 1216 (26), 5130–5139.
- Beltran J., López F.J., Hernández F. (2000) Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885 (1–2), 389–404.
- Bontempo L., Perini M., Pianezze S., Horacek M., Roßmann A., Kelly S.D., Camin F. (2023) Characterization of beef coming from different European countries through stable isotope (H, C, N, and S) ratio analysis. *Molecules*, 28 (6).
- Boudebouz A., Boudalia S., Boussadia M.I., Gueroui Y., Habila S., Bousbia A., Symeon G.K. (2022) Pesticide residues levels in raw cow's milk and health risk assessment across the globe: A systematic review. *Environmental Advances*.
- Chen L., Li X., Li Z., Deng L. (2020) Analysis of 17 elements in cow, goat, buffalo, yak, and camel milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *RSC Advances*, 10 (12), 6736–6742.
- Chivas A.R., Andrews A.S., Lyons W.B., Bird M.I., Donnelly T.H. (1991) Isotopic constraints on the origin of salts in Australian playas. 1. Sulphur. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 84 (1–4), 309–332.
- Christoph N., Hermann A., Wachter H. (2015) 25 years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook. *BIO Web of Conferences*, 5, 02020.
- Chung S.W.C., Lam C.H. (2015) Development of a 15-class multiresidue method for analyzing 78 hydrophilic and hydrophobic veterinary drugs in milk, egg and meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7 (16), 6764–6776.
- Cutrim C.S., Cortez M.A.S. (2018) A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*.
- Delgado F.J., González-Crespo J., Cava R., Ramírez R. (2011) Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chemistry*, 129 (3), 1156–1163.
- Ezequiel J.M.B., Sancanari J.B.D., Machado Neto O.R., da Silva Z.F., Almeida M.T.C., Silva D.A.V., van Cleef E.H.C.B. (2015) Effects of high concentrations of dietary crude glycerin on dairy cow productivity and milk quality. *Journal of Dairy Science*, 98 (11), 8009–8017.
- Faroon O., Ruiz P. (2016) Polychlorinated biphenyls: New evidence from the last decade. *Toxicology and Industrial Health*, 32 (11), 1825–1847.
- Fattore E., Fanelli R., Dellatte E., Turrini A., di Domenico A. (2008) Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*, 73 (1 Suppl).
- Foroutan A., Guo A.C., Vazquez-Fresno R., Lipfert M., Zhang L., Zheng J., Wishart D.S. (2019) Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (17), 4897–4914.



- Frank D.C., Owen C.M., Patterson J. (2004) Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 37 (2), 139–154.
- Gill J.P.S., Bedi J.S., Singh R., Fairoze M.N., Hazarika R.A., Gaurav A., Kakkar M. (2020) Pesticide Residues in Peri-Urban Bovine Milk from India and Risk Assessment: A Multicenter Study. *Scientific Reports*, 10 (1).
- Gregorčič S.H., Potočnik D., Camin F., Ogrinc N. (2020) Milk Authentication: Stable Isotope Composition of Hydrogen and Oxygen in Milks and Their Constituents. *Molecules*, 25 (17).
- Hampel D., Dror D.K., Allen L.H. (2018) Micronutrients in Human Milk: Analytical Methods. *Advances in Nutrition*, 9, 313S–331S.
- Jadhav M.R., Pudale A., Raut P., Utture S., Ahammed Shabeer T.P., Banerjee K. (2019) A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 272, 292–305.
- Jaillais B., Bertrand V., Auger J. (1999) Cryo-trapping/SPME/GC analysis of cheese aroma. *Talanta*, 48 (4), 747–753.
- Jia Q., Qiu J., Zhang L., Liao G., Jia Y., Qian Y. (2022) Multiclass Comparative Analysis of Veterinary Drugs, Mycotoxins, and Pesticides in Bovine Milk by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Hybrid Quadrupole–Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Foods*, 11 (3).
- Kanan S., Samara F. (2018) Dioxins and furans: A review from chemical and environmental perspectives. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 17, 1–13.
- Kang H.S., Kim M.K., Kim E.J., Choe W.J. (2020a) Determination of 66 pesticide residues in livestock products using QuEChERS and GC-MS/MS. *Food Science and Biotechnology*, 29 (11), 1573–1586.
- Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Walker S., Widmer M. (2014) Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*, 820, 56–68.
- Kiani A., Arabameri M., Shariatifar N., Mehraie A., Tooryan F., Ghanbariasad A., Shahsavari S. (2023) Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in dairy products by modified QuEChERS/GC-QqQ-MS/MS method: A risk assessment study. *Food Science and Nutrition*, 11 (6), 2895–2906.
- Knutsen H.K., Alexander J., Barregård L., Bignami M., Brüschweiler B., Ceccatelli S., Hoogenboom L. (2018) Risk for animal and human health related to the presence of dioxins and dioxin-like PCBs in feed and food. *EFSA Journal*, 16 (11).
- Krivohlavek A., Mikulec N., Budeč M., Barušić L., Bošnić J., Šikić S., Vitale K. (2023) Migration of BPA from Food Packaging and Household Products on the Croatian Market. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20 (4).
- Leksrisompong P.P., Miracle R.E., Drake M. (2010) Characterization of flavor of whey protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10), 6318–6327.
- Lorenzi V., Angelone B., Ferretti E., Galli A., Tonoli M., Donati M., Bertocchi L. (2020) PCDD/Fs, DL-PCBs, and NDL-PCBs in Dairy Cows: Carryover in Milk from a Controlled Feeding Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (7), 2201–2213.
- Maxwell R.J., Mondimore D., Tobias J. (1986) Rapid Method for the Quantitative Extraction and Simultaneous Class Separation of Milk Lipids. *Journal of Dairy Science*, 69 (2), 321–325.
- Mesa R., Kabir A., Samanidou V., Furton K.G. (2019) Simultaneous determination of selected estrogenic endocrine disrupting chemicals and bisphenol A residues in whole milk using fabric phase sorptive extraction coupled to HPLC-UV detection and LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 42 (2), 598–608.
- Momchilova S.M., Nikolova-Damyanova B.M. (2012) Advances in silver ion chromatography for the analysis of fatty acids and triacylglycerols-2001 to 2011. *Analytical Sciences*, 28 (9), 837–844.
- Moudgil P., Bedi J.S., Aulakh R.S., Gill J.P.S., Kumar A. (2019) Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. *Food Analytical Methods*, 12 (2), 338–346.
- O'Sullivan R., Monahan F.J., Bahar B., Kirwan L., Pierce K., O'Shea A., Schmidt O. (2021) Stable isotope profile (C, N, O, S) of Irish raw milk: Baseline data for authentication. *Food Control*, 121, 107643.
- O'Sullivan R., Schmidt O., O'Sullivan M., Cama-Moncunill R., Monahan F.J. (2023) Isolation of casein for stable isotope ratio analysis of butter, cheese, and milk powder. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 37 (5).
- Park J.M., Kim N.K., Yang C.Y., Moon K.W., Kim J.M. (2014) Determination of the authenticity of dairy products on the basis of fatty acids and triacylglycerols content using GC analysis. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34 (3), 316–324.
- Pèrès C., Viallon C., Berdagué J.L. (2001) Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization of cheeses.

Analytical Chemistry, 73 (5), 1030–1036.

Perini M., Thomas F., Cabañero Ortiz A.I., Simoni M., Camin F. (2022) Stable isotope ratio analysis of lactose as a possible potential geographical tracer of milk. *Food Control*, 139, 109051.

Potočnik D., Nečemer M., Perišić I., Jagodic M., Mazej D., Camin F., Ogrinc N. (2020) Geographical verification of Slovenian milk using stable isotope ratio, multi-element and multivariate modelling approaches. *Food Chemistry*, 326.

Quigley A., Connolly D., Cummins W. (2018) The application of dispersive liquid–liquid microextraction in the analyses of the fatty acid profile in bovine milk in response to changes in body condition score. *Journal of Chromatography B*, 1073, 130–135.

Rashidinejad A., Birch E.J., Everett D.W. (2016) Interactions between milk fat globules and green tea catechins. *Food Chemistry*, 199, 347–355.

Rocchetti G., Ghilardelli F., Mosconi M., Masoero F., Gallo A. (2022) Occurrence of Polyphenols, Isoflavonoids, and Their Metabolites in Milk Samples from Different Cow Feeding Regimens. *Dairy*, 3 (2), 314–325.

Rodinkov O.V., Bugaichenko A.S., Moskvina L.N. (2020) Static Headspace Analysis and Its Current Status. *Journal of Analytical Chemistry*.

Székelyhidi R., Lakatos E.H., Ajtony Z. (2020) Application of the SPME technique for determine the quality indicators of dairy products. *Journal of Food Investigation*, 66.

Tunick M.H., Iandola S.K., Van Hekken D.L. (2013) Comparison of spme methods for determining volatile compounds in milk, cheese, and whey powder. *Foods*, 2 (4), 534–543.

Vaz A., Cabral Silva A.C., Rodrigues P., Venâncio A. (2020) Detection Methods for Aflatoxin M1 in Dairy Products. *Microorganisms*, 8 (2).

Yaminifar S., Aenehvand S., Ghelichkhani G., Ahmadloo M., Arabameri M., Moazzen M., Shariatifar N. (2021) The measurement and health risk assessment of polychlorinated biphenyls in butter samples using the QuEChERS/GC-MS method. *International Journal of Dairy Technology*, 74 (4), 737–746.

Yang L., Li H., Zeng F., Liu Y., Li R., Chen H., Wu Y. (2012) Determination of 49 organophosphorus pesticide residues and their metabolites in fish, egg, and milk by dual gas chromatography-dual pulse flame photometric detection with gel permeation chromatography cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (8), 1906–1913.

Zazzo A., Monahan F.J., Moloney A.P., Green S., Schmidt O. (2011) Sulphur isotopes in animal hair track distance to sea. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25 (17), 2371–2378.

Zhan J., Yu X.J., Zhong Y.Y., Zhang Z.T., Cui X.M., Peng J.F., Zhu Y. (2012) Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 906, 48–57.