

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

mr RADIVOJ B. PETRONIJEVIĆ

ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI PRIMENE NOVIH
METODA ZA KONTROLU UPOTREBE PRIRODNIH
I VEŠTAČKIH BOJA KOD PROIZVODA OD MESA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2013. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

RADIVOJ B. PETRONIJEVIĆ

INVESTIGATION OF APPLICATION POSSIBILITIES
OF NOVEL ANALYTICAL METHODS FOR
CONTROLLING THE ADDITION OF NATURAL
AND ARTIFICIAL DYES IN MEAT PRODUCTS

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2013.

Mentor:

Dr Ilija Vuković

redovni profesor (u penziji)

Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Članovi komisije:

Dr Dušanka Milojković-Opsenica

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Dr Vesna Matekalo-Sverak,

viši naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa

Beograd

Dr Rada Baošić

docent

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Dr Dragan Vasilev

docent

Univerzitet u Beogradu

Fakultet veterinarske medicine

Datum odbrane:

Posvećeno Filipu, Konstantinu i Maji

Želim da izrazim svoju iskrenu zahvalnost svima onima koji su mi pomogli u realizaciji ove disertacije. Pre svih to je moj mentor, prof. dr Ilija Vuković, koji je učestvovao u svim istraživanjima i svojim znanjem, stručnim savetima i sistematičnošću pomogao da ovaj rad bude uobličen i ostvaren. Zahvalnost dugujem poštovanim članovima komisije dr Vesni Matekalo-Sverak, direktoru Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, dr Dušanki Milojković-Opsenica, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, dr Radi Baošić, docentu Hemijskog fakulteta u Beogradu i dr Draganu Vasilevu, docentu Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu, koji su mi tokom višegodišnje saradnje, kao i tokom pisanja ove disertacije pružali značajnu pomoć.

Zahvaljujem se dr Aureliji Spirić, naučnom savetniku Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, koja je nesebično prenosila znanje i iskustvo i bez čije pomoći izrada ove disertacije ne bi bila izvodljiva.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim kolegama i višegodišnjim saradnicima iz Instituta za higijenu i tehnologiju mesa, dr Milanu Milijaševiću i Jeleni Babić, dipl. vet., koji su, svojim stručnim znanjem, dali značajan doprinos u izradi i senzornom ocenjivanju eksperimentalnih proizvoda.

Svoju zahvalnost dugujem zaposlenima u industriji mesa "KOTEX" iz Surčina, naročito tehnologu Branku Čaliću, dipl. vet., koji su omogućili izradu eksperimentalnih barenih kobasica u svom pogonu.

Značajna pomoć mi je bila višegodišnja saradnja sa mr Dejanom Trbović, dipl. hem. na polju statističke obrade podataka i u zajedničkom radu na projektima.

Ne mogu da propustim priliku da se zahvalim i svojoj porodici, supruzi Maji i sinovima Filipu i Konstantinu, koji su imali razumevanje za moj rad i davali mi podršku tokom izrade doktorske disertacije.

Na kraju, još jednom koristim priliku da se najsrdačnije zahvalim svima koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi i pisanju ove disertacije.

Naslov doktorske disertacije: ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI PRIMENE NOVIH
METODA ZA KONTROLU UPOTREBE
PRIRODNIH I VEŠTAČKIH BOJA KOD
PROIZVODA OD MESA

Rezime:

Kontrola upotrebe boja koje se kao aditivi danas široko koriste u proizvodnji hrane ima veliki značaj za bezbednost i kvalitet proizvoda od mesa. Pored zakonskih regulativa važnu ulogu imaju i analitičke metode za utvrđivanje prisustva i određivanje količine boja. Cilj ove doktorske disertacije je bio da se razviju metode za istovremeno, rutinsko određivanje više boja kod različitih proizvoda od mesa.

Analiza podataka iz literature pokazala je da ima malo analitičkih metoda za određivanje boja u proizvodima od mesa, da referentna metoda obuhvata samo veštačke boje, priprema uzoraka je, često, komplikovana i nepodesna za rutinski rad i da su savremene analitičke metode tečne hromatografije primenjene za određivanje boja u bezalkoholnim i alkoholnim pićima, konditirskim proizvodima, želeu, džemovima itd., ali ne i kod proizvoda od mesa.

Za ispitivanja su izrađivani eksperimentalni proizvodi od mesa (finousitnjena barena kobasica - „pariska kobasica“ i konzerva od mesa u komadima - „kuvana šunka“), i proizvodi od mesa sa tržišta iz navedenih grupa. Eksperimentalni proizvodi su izrađivani u industrijskoj klanici i radionici Instituta za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd. Izrađeni su kontrolni proizvodi bez dodatih boja i proizvodi u koje su u toku postupka izrade posebno dodavane boje Košenila, Ponso 4R i Alura crvena AC.

U toku ispitivanja proizvoda od mesa korišćene su hemijske i fizičko-hemijske metode: (određivanje sadržaja azota (proteina): SRPS ISO 937:192, određivanje sadržaja slobodne masti: SRPS ISO 1444:1998, određivanje sadržaja vlage: SRPS ISO 1442:1998, određivanje sadržaja ukupnog pepela: SRPS ISO 936:1999 i određivanje pH vrednosti: SRPS ISO 2917:2004), senzorna ispitivanja boje preseka proizvoda, ujednačenosti boje preseka i postojanost boje 10 minuta nakon narezivanja (kvantitativna deskriptivna analiza, zasnovana na metodi SRPS ISO 6564:2001 i SRPS ISO 6658:2001), originalna metoda visokoeфикаsne tečne hromatografije sa fotodiodnom detekcijom (HPLC – PDA) sa prethodnim izolovanjem boja iz uzorka

ubrzanom ekstrakcijom na visokom pritisku i temperaturi i merenje boje preseka proizvoda CIE L*a*b kolorimetrijom.

Za statističku obradu rezultata primenjene su deskriptivna statistika, *t*-testovi za poređenje rezultata, analiza varijanse (ANOVA), metoda najmanjih kvadrata, višestruka linearna regresija i eksperimentalni dizajn za razvoj i optimizaciju metoda ekstrakcije i hromatografskog određivanja ispitivanih boja u proizvodima od mesa.

Rezultati ispitivanja hemijskog sastava i pH vrednosti eksperimentalnih proizvoda su pokazali da su proizvodi relativno ujednačenog hemijskog sastava i u skladu da kriterijumima kvaliteta za te proizvode. Senzornim ocenjivanjima proizvoda je utvrđeno da postoji značajna razlika u prihvatljivosti boje proizvoda u zavisnosti od vrste i količine dodate boje i da se dodavanjem boje dobijaju bolje karakteristike boje preseka nego kod proizvoda bez dodate boje. Rezultati *t*-testa ocena prihvatljivosti boje preseka su pokazali da je boja preseka proizvoda postojana. CIE L*a*b* kolorimetrijom je utvrđena linearna zavisnost promene a* vrednosti od povećanja količine boja i da b* vrednost opada sa povećanjem količine Košenile, a kod proizvoda sa dodatim sintetičkim bojama vrednost b* blago raste.

Hromatografsko razdvajanje boja je postignuto gradijentom sastava mobilne faze (50 mmol/dm³ amonijum acetatni pufer i acetonitril), na reversno-faznoj C18 koloni sa česticama sa čvrstim jezgrom uz fotodiodnu UV/VIS detekciju. Optimizacijom ubrzane ekstrakcije eksperimentalnim dizajnom, najefikasnije izolovanje boja iz proizvoda od mesa je postignuto metanolom na temperaturi od 120 °C u četiri ekstrakciona ciklusa od po 11 minuta. Kalibracijom metode omogućeno je određivanje sadržaja boja u proizvodima od mesa u intervalu od 1,0 do 100,0 mg/kg uzorka. Dobijeni povratni prinosi boja su bili veći od literaturnih podataka povratnog prinosa Ponsa 4R (76,9 % – 83,6 %) i Alura crvene AC (80,9 % – 84,6 %)

Rezultati višestruke linearne regresije CIE L*a*b* kolorimetrije i tečnehromatografskog određivanja pokazuju da je moguće primeniti CIE L*a*b* kolorimetriju za brzo određivanje dodate boje kod fino usitnjenih barenih kobasica. Dobijeni rezultati su provereni dvosmernim *t*-testom za bliske vrednosti standardnih devijacija.

Utvrđeno je da više od 2/3 ispitanih proizvoda sa tržišta sadrži boje koje se mogu odrediti metodom tečne hromatografije i brzom metodom zasnovanom na CIE

L*a*b* kolorimetriji. Preko polovine je sadržavalo Košenilu, u 12 % je potvrđen sadržaj boje Alura crvena AC, a Ponso 4R nije otkriven ni u jednom uzorku. U više od polovine proizvoda je potvrđeno prisustvo dodate boje koja nije deklarirana, a samo u 15 % ispitanih proizvoda je bila deklarirana dodata boja Košenila (E 120). Navedeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da većina ispitanih proizvoda koji se nalaze na domaćem tržištu u pogledu upotrebe boja nisu u skladu sa zakonskim propisima. Analiza primene CIE L*a*b* kolorimetrijskih modela kod ispitivanih proizvoda od mesa pokazuje da se modelima dobijaju prihvatljivi rezultati.

Ključne reči: prehrambene boje, L*a*b* kolorimetrija, tečna hromatografija, proizvodi od mesa.

Naučna oblast: biotehničke nauke.

Uža naučna oblast: veterinarstvo.

UDK: 637.5:667.2

Title of the Doctoral dissertation: INVESTIGATION OF APPLICATION
POSSIBILITIES OF NOVEL ANALYTICAL
METHODS FOR CONTROLLING THE
ADDITION OF NATURAL AND ARTIFICIAL
DYES IN MEAT PRODUCTS

Abstract:

Proper control of dyes that are widely used as food additives in production of foodstuffs is of considerable significance for safety and quality of meat products. Besides the adoption of legislative regulating this area, analytical methods for qualitative and quantitative determination of dyes also play an important role. The aim of this Doctoral dissertation was to develop routine analytical methods for simultaneous determination of multiple dyes in various meat products.

Review of available literature showed that the number of analytical methods for determination of dyes in meat products is scarce, while the current reference method is intended for artificial dyes only. Furthermore, sample preparation techniques are often tedious and time-consuming, while available modern liquid chromatographic methods are mainly focused on dyes determination in alcoholic and non-alcoholic beverages, confectionary products, jellies, marmalades, etc., as opposed to availability of such methods applicable to meat products.

For the purposes of investigations, experimental meat products were manufactured (finely grinded cooked sausage – “Parisian sausage” and chopped meat products – “cooked ham”), and a number of products of the same type were obtained from the retail as well. Manufacturing took place in industrial slaughterhouse and within the facilities of the Institute of meat hygiene and technology, Belgrade. Two types of products were made – control batches without addition of dyes and experimental batches – products with addition of the following dyes: Cochineal, Ponceau 4R and Allura red AC.

The following chemical and physico-chemical methods were used during the experiments: (determination of nitrogen (protein) content SRPS ISO 937:192, determination of free fats content: SRPS ISO 1444:1998, determination of moisture

content: SRPS ISO 1442:1998, determination of total ash content: SRPS ISO 936:1999 and determination of pH: SRPS ISO 2917:2004), sensory investigations of cut-surface color, consistency of cut-surface color and color stability ten minutes after slicing (quantitative descriptive test based on the methods SRPS ISO 6564:2001 and SRPS ISO 6658:2001), original liquid chromatographic method with photodiode array detection (HPLC – PDA) with dyes isolation from the sample using accelerated solvent extraction under high pressure and high temperature and color measuring of products' cut-surface using CIE L*a*b colorimetry.

Statistical analysis was carried-out using descriptive statistics, *t*-tests for results comparison, variance analysis (ANOVA), least squares method, multiple linear regression and experimental design for development and optimization of extraction and chromatographic determination of investigated dyes in meat products.

The results of chemical composition and pH values of experimental products demonstrated that the products are of relatively uniform composition and are in accordance with regulatory quality criteria that are set for these product types. Sensory analysis showed significant differences in products acceptability in respect to color depending on type and quantity of added dye. Dye addition resulted in better properties of cut-surface compared to products without added dye. The results of *t*-test (evaluation of acceptability of cut-surface color) demonstrated color stability of the products. CIE L*a*b* colorimetry showed linear dependence of a* value change when quantity of dyes is increased, as well as decrease of b* value resulting from increase of added Cochineal. On the other side, b* value slightly increased in products containing synthetic dyes.

Chromatographic separation of dyes was achieved using gradient elution on reverse phase C18 column with solid core particles and mobile phase consisting of 50 mmol/dm³ ammonia acetate buffer and acetonitrile. Detection of dyes was achieved using photodiode array UV/VIS detector. Based on the results of optimization of accelerated solvent extraction by experimental design, the highest extraction efficiency was achieved using methanol at the temperature of 120°C in four 11-minutes extraction cycles. Method calibration enabled determination of dyes content in the concentration range from 1.0 to 100.0 mg/kg of sample. Obtained recovery values were higher

compared to literature data for Ponceau 4R (76,9 % – 83,6 %) and Allura red AC (80,9 % – 84,6 %).

Results of multiple linear regression of CIE L*a*b* colorimetry and liquid chromatographic determination show that it is possible to apply CIE L*a*b* colorimetry for rapid determination of added dyes in finely grinded cooked sausages. Obtained results were re-validated using two-way *t*-test for close values of standard deviations.

It has been established that more than 2/3 of tested products from retail contain dyes that can be determined by liquid chromatographic method, as well as by rapid method based on CIE L*a*b* colorimetry. More than 50% of these samples contained Cochineal, 12% of the samples contained Allura red AC, while Ponceau 4R was not determined in any of analyzed samples. Also, more than half of the samples from the market contained dyes that were not labeled on the product, while only 15% of the samples were properly labeled to contain Cochineal dye (E 120). Obtained result unambiguously demonstrate that majority of tested samples are not in accordance with national legislative in respect to addition of dyes. Analysis of application of CIE L*a*b* colorimetric models in meat products shows acceptable results using such modeling.

Key words: food dyes, L*a*b* colorimetry, liquid chromatography, meat products.

Scientific area: biotechnical sciences.

Narrow scientific area: veterinary medicine.

UDK: 637.5:667.2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Fizička i hemijska svojstva boja.....	3
2.1.1. Košenila.....	3
2.1.2. Ponso 4R.....	5
2.1.3. Alura crvena AC.....	5
2.2. Istorijski pregled upotrebe boja u hrani.....	6
2.3. Razvoj zakonske regulative o upotrebi boja.....	7
2.4. Zakonski propisi o upotrebi boja u hrani.....	10
2.4.1. Košenila.....	10
2.4.2. Ponso 4R.....	11
2.4.3. Alura crvena AC.....	12
2.5. Uticaj boja na zdravlje ljudi.....	13
2.6. Analitičke metode za određivanje boja.....	16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I ZADACI RADA	27
3.1. Ciljevi istraživanja.....	27
3.2. Zadaci rada.....	27
4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA	29
4.1. Rastvarači za ekstrakciju i pripremu mobilne faze za tečnu hromatografiju.....	29
4.2. Priprema rastvora amonijum acetatnog pufera.....	29
4.3. Priprema zbirnog standardnog rastvora boja.....	29
4.4. Izrada eksperimentalnih proizvoda od mesa.....	30
4.4.1. Izrada eksperimentalne „pariske kobasice“.....	30
4.4.2. Izrada eksperimentalne „kuvane šunke“.....	32
4.5. Metode ispitivanja.....	34
4.5.1. Hemijske metode ispitivanja.....	34
4.5.1.1. Određivanje sadržaja proteina.....	34
4.5.1.2. Određivanje sadržaja slobodne masti.....	34
4.5.1.3. Određivanje sadržaja vlage.....	34
4.5.1.4. Određivanje sadržaja ukupnog pepela.....	34

4.5.2. Fizičko-hemijske metode.....	35
4.5.2.1. Merenje pH vrednosti.....	35
4.5.3. Senzorsko ispitivanje boje.....	35
4.5.4. Određivanje boje (CIE L*a*b*) kolorimetrijom.....	36
4.5.5. Razvoj tečno-hromatografske metode za određivanje boja u proizvodima od mesa (HPLC analiza).....	36
4.5.5.1. Određivanje uslova za tečnu hromatografiju.....	37
4.5.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i pritisku.....	38
4.5.5.3. Optimizacija uslova ekstrakcije.....	39
4.5.6. Metode statističke obrade rezultata.....	42
5. REZULTATI ISPITIVANJA.....	44
5.1. Hemijski sastav eksperimentalnih proizvoda.....	44
5.1.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“.....	44
5.1.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“.....	46
5.2. Merenje pH vrednosti.....	47
5.3. Senzorne ocene boje eksperimentalnih proizvoda.....	48
5.3.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“.....	48
5.3.2. Eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“.....	50
5.4. Rezultati kolorimetrijskih ispitivanja.....	52
5.4.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“.....	52
5.4.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“.....	54
5.5. Razvoj tečno-hromatografske metode za određivanje boja u proizvodima od mesa (HPLC analiza).....	56
5.5.1. Određivanje uslova za tečnu hromatografiju.....	56
5.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku.....	57
5.5.3. Optimizacija ekstrakcije i kalibracija metode.....	59
5.5.4. Određivanje sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima od mesa.....	61
5.5.5. Višestruka linearna regresija rezultata CIE L*a*b* i tečnohromatografskog ispitivanja eksperimentalnih barenih kobasica.....	63
5.5.6. Ispitivanja proizvoda sa tržišta.....	65
6. DISKUSIJA.....	68
6.1. Hemijski sastav eksperimentalnih proizvoda.....	68

6.1.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“	68
6.1.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“	71
6.2. pH vrednost eksperimentalnih proizvoda.....	73
6.3. Senzorna ocena boje eksperimentalnih proizvoda.....	74
6.3.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“	74
6.3.2. Eksperimentalna konzerva „kuvana šunka“	76
6.4. Kolorimetrijsko ispitivanje (CIE L*a*b*) eksperimentalnih proizvoda.....	78
6.4.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“	79
6.4.2. Eksperimentalna konzerva „kuvana šunka“	82
6.5. Tečno-hromatografsko određivanje boja (HPLC analiza).....	86
6.5.1. Određivanje uslova za tečnu hromatografiju.....	86
6.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku.....	91
6.5.3. Optimizacija ekstrakcije i kalibracija metode.....	93
6.5.4. Određivanje sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima od mesa.....	98
6.5.5. Višestruka linearna regresija rezultata CIE L*a*b* i tečnohromatografskog ispitivanja eksperimentalnih barenih kobasica.....	99
6.5.6. Ispitivanja proizvoda sa tržišta	103
7. ZAKLJUČAK.....	106
8. LITERATURA.....	108

1. UVOD

Meso je jedna od najznačajnijih namirnica u ishrani ljudi. Meso obezbeđuje potrebne hranljive i gradivne materije za sve uzraste. Pošto je sveže meso osetljiva namirnica, koja je podložna brzom kvarenju, ljudi su oduvek obrađivali meso praveći mnogobrojne proizvode koje su mogli da koriste kao hranu duže vreme. Usoljavanjem, dodavanjem začina i drugih dodataka, tzv. aditiva, sušenjem i pakovanjem u omotače i na brojne druge načine, produžavala se održivost mesu i proizvodima od mesa.

Danas je industrija mesa, prema proizvedenim količinama, jedna od najznačajnijih proizvodnih grana svetske privrede. Tehnologija obrade mesa je kompleksan postupak koji se neprestano usavršava, što, najčešće, vodi ka povećavanju cene proizvoda od mesa. Da bi se zadržala postojeća cena ili proizveli jeftini proizvodi od mesa, u toku procesa proizvodnje se teži manjoj količini otpada, odnosno efikasnijem iskorišćenju sirovine. To podrazumeva korišćenje delova tela životinje koji se, ranije, nisu upotrebljavali kao sirovine za proizvode od mesa ili su se koristili samo u nekim, specifičnim proizvodima.

Pošto je izgled proizvoda od mesa jedna od najvažnijih karakteristika za potrošača, a može bitno da se menja u toku proizvodnje u zavisnosti od sirovina i tehnološkog postupka izrade, jedan od načina poboljšavanja izgleda je upotreba prehrambenih boja. U tu svrhu se najčešće koriste crvene boje, bilo da su veštačke ili prirodne.

Sastav i kvalitet proizvoda od mesa i upotreba prehrambenih boja su, u svetu i u našoj zemlji, zakonski regulisani. I pored toga, menjanje sastava i kvaliteta proizvoda, kao i upotreba dozvoljenih i nedozvoljenih boja radi prikrivanja „falsifikovanja“ proizvoda, u cilju povećanja profita proizvođača su, nažalost, relativno česta pojava. Na ovaj način se, ne samo finansijski, već i zdravstveno obmanjuje potrošač, jer takav proizvod ne obezbeđuje propisane i očekivane nutritivne potrebe konzumenta. Sa druge strane, otkriće da neke od upotrebljenih boja za „maskiranje“ lošijeg kvaliteta proizvoda od mesa mogu imati negativne zdravstvene posledice kod osetljivih osoba i dece, stavlja upotrebu prehrambenih boja u sam centar istraživanja poslednjih decenija. Dokazano je kancerogeno dejstvo Eritrozina, crvene boje čija je upotreba dozvoljena u alkoholnim

pićima i kandiranim višnjama, kao i uticaj Tartrazina na pojavu ekcema i urtikarije kod osetljivih osoba. Postoji sumnja da Košenila i neke dozvoljene veštačke crvene boje (Ponso 4R, crvena AG i Alura crvena AC) izazivaju pojavu hiperaktivnosti kod dece, kožnih bolesti kod osetljivih osoba i probleme kod osoba sa astmom. Ne postoje pouzdani dokazi da su ove boje pojedinačno izazivači pomenutih zdravstvenih problema, ali postoji opravdana indicija da mogu nepovoljno uticati u smeši, međusobno ili sa drugim prehrambenim bojama i aditivima.

Kontrola kvaliteta i zdravstvene ispravnosti proizvoda od mesa zahteva odgovarajuća „oruđa“ da bi bila adekvatno sprovedena. Pored zakonskih regulativa, potrebna je i odgovarajuća podrška koja podrazumeva adekvatne, brze i pouzdane analitičke metode za određivanje vrste i količine upotrebljenih boja u proizvodima od mesa.

Referentna metoda za određivanje boja u mesu i proizvodima od mesa (ISO 13496:2000) se zasniva na određivanju boja tankoslojnom hromatografijom. Bez adekvatne opreme na ovaj način se samo može identifikovati prisustvo boja koje su obuhvaćene ovom metodom. Nove metode za određivanje boja u proizvodima od mesa moraju ispuniti nekoliko bitnih zahteva; da su fleksibilne u smislu proširivanja broja ispitivanih boja; da se mogu primeniti na različite proizvode od mesa i da su pogodne za brzu implementaciju i rutinsku upotrebu. Cilj ovog doktorskog rada je da odgovori na ove zahteve razvojem, validacijom i primenom novih metoda za određivanje boja u proizvodima od mesa.

2. PREGLED LITERATURE

U pregledu dostupnih literaturnih podataka i objavljenih naučnih radova koji se odnose na predmet ispitivanja ove disertacije, dat je osvrt na najvažnije hemijske i fizičke karakteristike ispitivanih boja, istorijat upotrebe boja za bojenje hrane, zakonsku regulativu upotrebe prehrambenih boja, upotrebu boja u proizvodnji hrane danas, zdravstvenu bezbednost upotrebe boja u hrani i analitičke metode za određivanje sadržaja boja. Na kraju ovog poglavlja dat je kratak rezime, iz dostupnih literaturnih podataka o određivanju boja u proizvodima od mesa različitim analitičkim postupcima.

2.1. Fizička i hemijska svojstva boja

Poznavanje fizičkih i hemijskih svojstava ispitivanih prehrambenih boja je od suštinskog značaja za izbor odgovarajućih tehnika analitičkog određivanja njihove količine u proizvodima od mesa. Pored toga, na osnovu poznavanja ovih svojstava može se, u određenoj meri, pretpostaviti njihovo metaboličko ponašanje i postojanje rizika po zdravlje potrošača.

2.1.1. Košenila

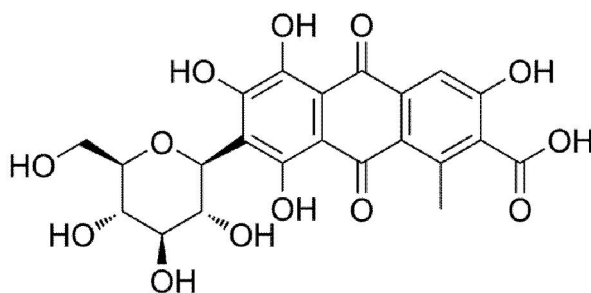
Košenila ili karminska kiselina (E 120) je prirodna boja (Sáenz i dr, 2004) koja se dobija iz tela ženki Košenila insekata (lat. *Dactilopiidae*). Ovi insekti žive na kaktusima (*Opuntia sp.*) u polusušnim oblastima Perua, Bolivije, Čilea, Kanarskih ostrva (Španija) i Meksika.

Proces dobijanja boje iz insekata je kompleksan i skup. Pre izolovanja insekti se ubijaju toplotom, na primer, potapanjem u toplu vodu, izlaganjem sunčevoj svetlosti ili u vreloj vodenoj pari. Tela insekata se suše, drobe i prosejavaju. Industrijska rafinacija podrazumeva uklanjanje masti i voska organskim rastvaračima, mlevenje, alkalnu ekstrakciju, flokulaciju i filtriranje, građenje nerastvornih lakova sa solima aluminijuma

i kalcijuma, odvajanje taloga centrifugiranjem, rastvaranje taloga, koncentrovanje boje i proveru čistoće. Raznovrsnost u izgledu komercijalne boje potiče od različitih metoda tretiranja insekata, postupka izolovanja i rafinacije boje. Pigment sadrži nekoliko srodnih jedinjenja od kojih je karminska kiselina najzastupljenija u ekstraktu.

Košenila je organska kiselina, glikozid antrahinona i sadrži nekoliko kiselinskih centara. Konstanta disocijacije karboksilne grupe u položaju 2 antrahinona je $pK_0 = 2,9$. Sledeća kiselinsko-bazna ravnoteža ($pK_1 = 5,4$) uključuje 6-hidroksilnu grupu. Kiselost, odnosno sposobnost otpuštanja protona, H^+ , hidroksilnih grupa u položajima 5 i 8 ($pK_2 = 8,7$ i $pK_3 = 12,2$) je smanjena zbog njihovog položaja u odnosu na karbonilnu grupu ($C=O$), odnosno zbog građenja unutarmolekulskih vodoničnih veza čime se otežava otpuštanje protona sa ovih grupa (Favaro *i sar.*, 2002). Po IUPAC nomenklaturi (International Union of Pure and Applied Chemistry; Međunarodna unija za čistu i primenjenu hemiju), Košenila je 7- α -D-glukopiranozil-9,10-dihidro-3,5,6,8-tetrahidroksi-1-metil-9,10-diokso-2-antracen-karboksilna kiselina (slika 1). Zbirna (kondenzovana) hemijska formula je $C_{22}H_{20}O_{13}$. Ima molekulsku masu 492,39. U registru Hemijskog apstrakta (Chemical Abstract Service, CAS) obeležena je brojem 1260-17-9 i u Indeksu boja (Colour Index, CI) brojem 75470.

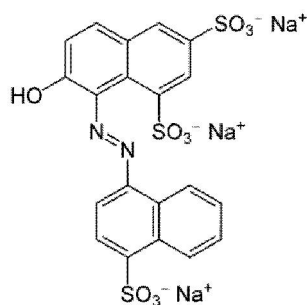
Košenila se dobro rastvara u vodi i etanolu, a slabo u organskim rastvaračima. Boja se menja sa promenom pH vrednosti rastvora, od žute na $pH = 3$, preko crvene ($pH = 5$) do ljubičaste u neutralnim rastvorima. Maksimum apsorpcije elektromagnetnog zračenja je na 494 nm (λ_{max}) u razblaženim kiselim rastvorima (0,02 mol/dm³ HCl).



Slika 1. – Strukturna formula karminske kiseline

2.1.2. Ponso 4R

Ponso 4R (E 124) je sintetička azo-boja sa formulom $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$. Po svom hemijskom sastavu, ova boja je natrijumova so sulfonske kiseline. Derivat je naftalena. Hemijski naziv je trinatrijum 2-hidroksi-1-(4-sulfonato-1-naftilazo)-naftalen-6,8-disulfonat. Ima molekulsku masu 604,48, CAS registarski broj 2611-82-7 i, u Indeksu boja, CI broj 16255. Strukturna formula je data na slici 2.



Slika 2. – Strukturna hemijska formula boje Ponso 4R

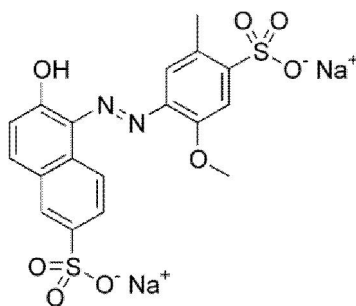
Danas je u upotrebi najmanje 115 komercijalnih naziva za ovo jedinjenje (ChemIDplus Advanced, 2007). Najčešće korišćeni nazivi u literaturi su Ponceau 4R, New Coccine Food Red 102 i Coccine Red.

Ponso 4R je rastvorljiv u vodi i slabo rastvoran u etanolu (Merck Index, 2006). Maksimalna apsorpcija elektromagnetnog zračenja je na 507 nm u vodenim rastvorima.

2.1.3. Alura crvena AC

Alura crvena AC (E 129) je sintetička azo-boja hemijske formule $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$. Kao i Ponso 4R, Alura crvena AC je natrijumova so sulfonske kiseline i, takođe, je derivat naftalena. Molekulska masa ove boje iznosi 496,43 i CAS registarski broj je 25956-17-6. Hemijski naziv je dinatrijum-2-hidroksi-1-(2-metoksi-5-metil-4-sulfonatofenilazo)-naftalen-6-sulfonat.

Strukturna formula je prikazana na Slici 3.



Slika 3. – Strukturna hemijska formula boje Alura crvena AC

Najmanje 17 sinonima je u upotrebi za ovu boju (ChemIDplus Advanced, 2007) od kojih su najčešći Alura crveno AC, Food Red No 40 i FD & C Red No 40. U prošlosti je korišćen naziv Crvena Z-4576.

Od fizičkih svojstava treba napomenuti da je Alura crvena AC rastvorna u vodi i slabo rastvorna u 50% etanolu (Merck Index, 2006). Maksimum apsorpcije elektromagnetnog zračenja je na 504 nm u vodenim rastvorima.

2.2. Istorijski pregled upotrebe boja u hrani

Upotreba prehrambenih boja široko je rasprostranjena. Supstance koje se koriste kao boje nemaju hranljivu vrednost, već služe za poboljšanje izgleda hrane i pića (Hersey, Heltzel, 2007; Gilman, 2003; Mebane, Rybolt, 1987). Pošto je izgled hrane podjednako važan kao i njen ukus, proizvođači obraćaju veliku pažnju očuvanju izgleda, jer se prirodna boja hrane može izgubiti tokom obrade. Dodavanjem prehrambenih boja održava se prihvatljiv izgled proizvoda.

Upotreba boja za bojenje hrane i pića je bila uobičajena i u davnim vremenima. Plinije Stariji, u prvom veku nove ere, navodi da se, pri proizvodnji galskih vina, koriste dim i ekstrakt aloje za poboljšanje boje i ukusa vina (Sharma i sar., 2011). Istorijski je dokumentovano da su se različite boje, pa čak i otrovne neorganske soli, na primer, bakar(II) sulfat, olovo(II) hromat i živa(II) sulfid, koristile za poboljšanje izgleda velikog broja prehrambenih proizvoda, kao što su puter, džemovi, kiseli krastavci i bombone (McKone, Bull, 1991). U 17. i 18. veku, kako se širila trgovina između Azije i Evrope, povećavao se broj supstanci za bojenje kojima se falsifikovala boja začina i

hrane (čaj, kafa, čokolada, itd). Kao što je ranije rečeno, najčešće su se dodavale toksične neorganske soli. Čaj je, na primer, bojen bakar(II) karbonatom, u hleb je dodavana kreda da se poveća „belina“, a boje mlevene ljute paprike i karija u prahu su bile falsifikovane olovo(IV) oksidom i sulfidom žive (Hutt i sar., 1984).

Oko 1800. je počeo brz razvoj nauke i korišćenje mernih instrumenata, kao što su vaga i mikroskop, čime je bio omogućen razvoj tehnika za utvrđivanje prisustva supstanci dodatih hrani. U knjigama i brošurama počinju da se pojavljuju kritike upotrebe potencijalno toksičnih jedinjenja za bojenje hrane. Frederik Akum, 1820. godine, objavljuje prvu raspravu o rokovima upotrebe hrane (Sharma i sar., 2011). Sredinom 19. veka u SAD je bilo skoro nemoguće naći hranu ili piće koje nije falsifikovano. Čak je i mleko bojeno u žuto olovo hromatom da bi se prikriilo razblaživanje vodom, pri čemu mleko dobija plavu nijansu.

Materijali za bojenje hrane se dramatično menjaju posle sredine osamnaestog veka. Engleski hemičar Vilijam Perkin (1838-1907) pravi od katrana kamenog uglja prvu sintetičku organsku boju 1856. godine, nazvanu „anilin ljubičasto“ ili „purpur“, (Garfield, Mauve, 2000). Nedugo potom, organske sintetičke boje i pigmenti počinju da zamenjuju toksične mineralne soli za bojenje hrane. Međutim, ova promena nije uklonila potencijalne zdravstvene probleme upotrebe boja, jer bezbednost organskih boja dobijenih iz katrana kamenog uglja dugo nije ispitivana.

2.3. Razvoj zakonske regulative o upotrebi boja

Sintetičke azo-boje čine oko 70% svih boja koje se koriste u prehrambenoj proizvodnji. Od toga, žute i crvene boje se koriste mnogo češće nego druge sintetičke boje. Sve crvene boje razmatrane u ovom radu su odobrene za upotrebu kao dodaci hrani.

Istorijski gledano, krajem 19. veka, sa pojavom veštačkih, organskih boja, potreba za utvrđivanjem bezbednosti upotrebe supstanci za bojenje hrane postaje nacionalni problem u Sjedinjenim Državama. Godine 1883, Harvi V. Vajli (1844-1930), glavni hemičar u vladinom telu koje je danas Američko Odeljenje za poljoprivredu, počinje

40-godišnju borbu sa ciljem poboljšanja bezbednosti hrane. Poznat kao „otac Zakona o čistoj hrani i lekovima“, Vajli je primarni autor ovog akta, koji je postao zakon 1906. Jedan od aspekata ovog Zakona je dizajniran da spreči korišćenje međudržavne trgovine i izvoza mesa i mesnih prerađevina koje sadrže boje, hemikalije, ili druge sastojke koji mogu učiniti meso neupotrebljivim ili rizičnim za ljudsku ishranu. Pored toga, Zakon navodi sedam organskih boja kao bezbedne za korišćenje u hrani – Ponso 3R (FD&C Red No. 1), Amarant (FD&C Red No. 2, E 123), Eritrozin (FD&C Red No. 3, E 127), Indigotin (FD&C Blue No. 2, E 132), jarko zelenu SF (FD&C Green No. 2), naftol žutu (FD&C Yellow No. 1) i narandžastu 1 (FD&C Orange No. 1). Nazivi u zagradi su FDA imena i, ako postoje, evropske oznake (E brojevi).

Između 1916. i 1929. godine, 10 boja je dodato listi odobrenih prehrambenih boja. To su Tartrazin (FD&C Yellow No. 5, E 102), Sudan I, puter žuta, žuta AB (FD&C Yellow No. 3), žuta OB (FD&C Yellow No. 4), Gvineja zelena (FD&C Green No. 1), zelena FCF (FD&C Green No. 3), Brillijant plava FCF (FD&C Blue No. 1, E 133), Ponso SX (FD&C Red No. 4) i Sanset žuta FCF (FD&C Yellow No. 6, E 110). Savezni zakon o bojama kao aditivima u hrani i prehrambenim proizvodima (Federal Color Additives Law), koji je stupio na snagu u julu 1960., dozvoljava nastavak upotrebe nekih od ovih boja kroz „privremeno“ odobrenje. Godine 1969., sovjetski naučnici su zaključili da dugotrajna upotreba Amaranta uzrokuje rak kod laboratorijskih životinja. FDA je naložila ponavljanje testova u laboratorijama u Americi, a dobijeni rezultati nisu doneli nikakav konačan zaključak. Ipak, FDA je zabranila upotrebu Amarant i Ponso SX 1976. godine (Corwin, Pines, 1976, Hopkins, 1976). FDA je predložila zamenu zabranjenih crvenih boja drugom sintetičkom organskom bojom, Alura crvenom AC (FD&C Red No. 40, E 129).

Bezbednost upotrebe prehrambenih boja ostaje problem i posle mnogo godina. Protivrečnosti su stalno prisutne, npr., zanimljivo je da SAD smatra upotrebu Eritrozina u prahu bezbednom, ali je zabranila upotrebu boje u obliku laka ili za površinsko oblaganje zbog toga što izaziva pojavu kancera kod pacova (FDA, 1990). FDA je zabranila Amarant 1976. godine dok je, iste godine, u Kanadi rečeno da ne postoji dovoljno dokaza u to vreme da opravda uklanjanje ove boje iz hrane. Amarant je još uvek u širokoj upotrebi širom sveta. Bezbednost Sudana I (zabranjen u SAD 1918.

godine) je bila pod lupom u Evropi tokom 1990-ih, a sada je zabranjen u Evropskoj Uniji i Kini. Nekoliko studija, sprovedenih 70-tih godina prošlog veka, dovelo je do zaključka da Tartrazin i Sanset žuta izazivaju alergijske reakcije i da mogu dovesti do hiperaktivnost kod dece (Feingold, 1968, Feingold, 1975).

Evropska organizacija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) trenutno ocenjuje nova istraživanja koja pokazuju da određene prehrambene boje izazivaju porast hiperaktivnosti kod dece (McCann i sar., 2007). Posledica ove evaluacije bi mogla da bude da proizvođači hrane i pića u Velikoj Britaniji uklone Sanset žutu, Tartrazin, Alura crvenu, Karmoizin (E 122), Ponso 4R (E 124) i hinolin žuto (E 104) iz svojih proizvoda u narednim godinama. Ovo može dovesti do toga da i FDA ponovo proceni bezbednost sedam sertifikovanih FD & C boja koje su trenutno dozvoljene u hrani u Sjedinjenim Državama.

Tabela 1 – Nazivi i oznake 14 sintetičkih prehrambenih boja čija je upotreba regulisana zakonskim uredbama SAD i EU.

Redni broj	FDA oznaka boje	Komercijalni naziv boje	Molekulska masa	E broj ^{a)}	CAS broj	Color Index broj
1	FD&C Blue 1 ^{b)}	Brilliant Blue FCF food blue 2	792,86	E 133	3844-45-9	42090
2	FD&C Blue 2 ^{b)}	Indigo Carmine food blue 1	466,36	E 132	860-22-0	73015
3	FD&C Green 3 ^{b)}	Fast Green FCF food green 3	808,86	-	2353-45-9	42053
4	FD&C Red 3 ^{b)}	Erythrosine food red 14	879,86	E 127	16423-68-0	45430
5	FD&C Red 40 ^{b)}	Allura Red AC food red 17	496,43	E 129	25956-17-6	16035
6	FD&C Yellow 5 ^{b)}	Tartrazine food yellow 4	534,37	E 102	1934-21-0	19140
7	FD&C Yellow 6 ^{b)}	Sunset Yellow FCF food yellow 3	452,37	E 110	2783-94-0	15985
8	FD&C Red 2 ^{c)}	Amaranth food red 9	604,47	E 123	915-67-3	16185
9	FD&C Red 4 ^{c)}	Ponceau SX food red 1	480,43	-	4548-53-2	14700
10		Ponceau 4R food red 7 ^{c)}	604,47	E 124	2611-82-7	16255
11		Carmoisine food red 3 ^{c)}	502,43	E 122	3567-69-9	14720
12	FD&C Yellow 10 ^{b)}	Quinoline Yellow food yellow 13	579,42	E 104	8004-92-0	47005
13		Green S food green 4 ^{c)}	576,62	E 142	3087-16-9	44090
14		Patent Blue V (violet) food blue 5 ^{c)}	582,66	E 131	20262-76-4	42051

^{a)} Identifikacioni broj boja čija je upotreba dozvoljena u hrani u EU. ^{b)} Odobrena upotreba od strane U.S. FDA a koriste se u svetu. ^{c)} U.S. FDA zabranjuje upotrebu, ali se koriste u drugim zemljama.

U tabeli 1 je dat spisak 14 sintetičkih prehrambenih boja koje su prisutne u regulativama upotrebe prehrambenih boja u Sjedinjenim Državama, Kanadi, Engleskoj, Irskoj, Francuskoj, Španiji, Nemačkoj, Kini, Japanu, Singapuru, Novom Zelandu i Australiji. Iako Ponso SX nije identifikovan u bilo kojoj od analiziranih prehrambenih boja, uključen je u listu zato što je i dalje dozvoljen u Kanadi. Treba napomenuti da

boje koje nemaju FD & C oznaku nisu dozvoljene za upotrebu u hrani u SAD. Takođe, boje navedene u tabeli 1 pod brojevima 3 i 9 nemaju E broj i zabranjene su za upotrebu u hrani u Evropskoj Uniji (EU). Uobičajena imena, E, CAS i Color Index (CI) brojevi su dati radi jasnoće i identifikacije ovih prehrambenih boja.

2.4. Zakonski propisi o upotrebi boja u hrani

Važećim zakonskim uredbama su regulisani vrsta, količina i kvalitet boja koje se mogu koristiti u hrani, kao i pri izradi proizvoda od mesa.

2.4.1. Košenila

Karminska kiselina se ranije uglavnom upotrebljavala za bojenje tekstila i kao boja za slikanje, dok se danas mnogo više upotrebljava u proizvodnji kozmetike, hrane i lekova. Boja rastvorna u vodi se koristi u alkoholnim pićima, često sa kalcijumovim karminom, dok se nerastvorljivi oblik ove boje mnogo češće koristi za bojenje hrane. Zajedno sa amonijum-karminom može se naći u alkoholnim pićima, pekarskim proizvodima i prelivima, keksu, kolačima, pićima, smrznutim proizvodima, pitama, nekim vrstama sira, sosovima i slatkišima.

U industriji mesa se, od svih boja koje su dostupne i dozvoljene, Košenila najviše koristi za poboljšavanje boje proizvoda od mesa. Neki od uzroka ovakve dominacije Košenile u proizvodima od mesa u odnosu na druge crvene boje su, recimo, što je za postizanje prihvatljive boje proizvoda dovoljna vrlo mala količina Košenile i što je većina drugih crvenih boja zabranjena za upotrebu u ovim proizvodima. Sa druge strane, cena ove boje je daleko viša nego cena sintetičkih boja.

Zakonske regulative Evropske Unije i Republike Srbije specificiraju da je dozvoljena količina Košenile, računato kao karminska kiselina, u proizvodima od mesa (kobasice, paštete, terine, *breakfast sausages* sa najmanje 6% žita *burger meat* sa najmanje 4% povrća i/ili žita) 100 mg/kg, dok je u kobasicama kao što su *Chorizo* kobasica i *Salchicon* dozvoljena u količini od 200 mg/kg (SG RS, 2013; 94/36/EC).

Pošto se Košenila dobija izolovanjem iz insekata, hrana koja sadrži ovu boju se ne smatra košer niti halal hranom.

2.4.2. Ponso 4R

Ponso 4R je azo-boja dozvoljena kao dodatak hrani u EU. Zdravstvena bezbednost upotrebe ove boje je proučavana od strane Zajedničke stručne komisije za dodatke hrani Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svetske zdravstvene organizacije (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA, 1983) i Naučnog komiteta za hranu (SCF 1984).

Specifikacija komercijalne boje za upotrebu u prehrambenoj industriji je definisana u propisima Evropske Unije (2008/128/EC, 2008) i Zajedničke stručne komisije za dodatke hrani Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svetske zdravstvene organizacije (JECFA, 2006).

Komercijalna boja za upotrebu u prehrambenoj industriji se sastoji od trinatrijum 2-hidroksi-1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,8-disulfonata i srodnih obojenih materija, zajedno sa natrijum hloridom i/ili natrijum sulfatom kao glavnim nebojenim komponentama. Ponso 4R je, najčešće, u obliku natrijumove soli, ali su soli kalcijuma i kalijuma takođe dozvoljene (2008/128/EC, 2008).

Zakonska regulativa specificira da navedeni sadržaj boje ne sme biti manji od 80% od ukupnog broja obojenih jedinjenja, računato kao natrijumova so. Preostalih 20% može biti natrijum hlorid ili natrijum-sulfat i <1% srodnih obojenih jedinjenja i 4-aminonaftalen-1-sulfonske kiseline, 7-hidroksinaftalen-1,3-disulfonske kiseline, 3-hidroksinaftalen-2,7-disulfonske kiseline, 6-hidroksinaftalen-2-sulfonske kiseline i 7-hidroksinaftalen-1,3,6-trisulfonske kiseline, poreklom iz proizvodnog procesa, zajedno <0,5%.

Maksimalno dozvoljene količine Ponsa 4R za bojenje hrane, prema zakonskim regulativama EU i naše zemlje, su od 50 do 500 mg/kg za različite namirnice. Ponso 4R je takođe dozvoljen u pićima na nivou do 200 mg/l. U proizvodima od mesa nije

dozvoljena upotreba ove boje osim u kobasicama *Salchichon*, *Chorizo* i *Sobrasada*, koje se proizvode u Španiji (SG RS, 2013; 94/36/EC).

Pravilnikom o prehranbenim aditivima iz 2013. godine u Republici Srbiji i Regulativom EU br. 1333 iz 2008. godine, u svim zemljama članicama, obavezno je na proizvodima koji sadrže Ponso 4R, pored oznake boje (E 124) navesti da „može nepovoljno da utiče na aktivnost i pažnju kod dece“ (SG RS, 2013; Reg. EC 1333, 2008).

2.4.3. Alura crvena AC

Alura crvena AC je azo-boja dozvoljena kao dodatak hrani u Evropskoj uniji i njena zdravstvena ispravnost upotrebe je proučavana od strane Zajedničke stručne komisije za dodatke hrani (JECFA 1980 i 1981), i Naučnog komiteta za hranu (SCF 1984 i 1989).

Specifikacija komercijalne boje za upotrebu u prehrambenoj industriji je definisana u propisima EU (2008/128/EC, 2008) i Zajedničke stručne komisije za dodatke hrani Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svetske zdravstvene organizacije (JECFA, 2006).

Alura crvena AC se sastoji od dinatrijum-2-hidroksi-1-(2-metoksi-5-metil-4-sulfonatofenilazo) naftalen-6-sulfonata i srodnih obojenih materija, zajedno sa natrijum hloridom i/ili natrijum sulfatom kao glavnim nebojenim komponentama. Alura crvena AC je natrijumova so; soli kalcijuma i kalijuma su takođe dozvoljene (2008/128/EC, 2008).

Sadržaj boje ne sme biti manji od 85% od ukupnih obojenih jedinjenja, računato kao natrijumova so. Preostalih 15% može biti natrijum hlorid ili natrijum sulfat, $\leq 3\%$ srodnih obojenih materija i $\leq 0,3\%$ 6-hidroksi-2-naftalen sulfonske kiseline i njene natrijumove soli, $\leq 0,2\%$ 4 -amino-5-metoksi-2-metilbenzen sulfonske kiseline, i $\leq 1\%$ 6,6-oksi-bis(2-naftalen sulfonske kiseline) dinatrijumove soli, poreklom iz proizvodnog procesa.

Alura crvena AC je dozvoljena sintetička boja za bojenje hrane u EU sa maksimalno dozvoljenim nivoom upotrebe od 25 do 500 mg/kg hrane za različite namirnice. Alura crvena AC je takođe dozvoljena u alkoholnim pićima na nivou do 200 mg/l i bezalkoholnim pićima do 100 mg/l. Dozvoljeni nivo u *Luncheon meat* i *Breakfast sausages* je 25 mg/kg. U ostalim proizvodima od mesa nije dozvoljena upotreba ove boje (SG RS, 2013; 94/36/EC).

Pravilnikom o prehrambenim aditivima iz 2013. godine u Republici Srbiji i Regulativom EU br. 1333 iz 2008. godine, u svim zemljama članicama, obavezno je na proizvodima koji sadrže boju Alura crvena AC, pored oznake boje (E 129) navesti da „može imati negativan uticaj na aktivnost i pažnju kod dece“ (SG RS 2013; Reg. EC 1333, 2008).

2.5. Uticaj boja na zdravlje ljudi

Od kada je utvrđeno da sintetička prehrambena boja Tartrazin (E 102) može prouzrokovati neželjene reakcije, objavljeni su brojni slučajevi koji opisuju reakcije netolerancije na hranu koja sadrži ovu i druge sintetičke boje pojedinačno ili u smeši (TemaNord, 2002). Međutim, većina objavljenih istraživanja su neadekvatno izvođena, bez kontrolnog uzorka i izvršena u nedovoljno dugom periodu da bi se ispoljili i procenili efekti ishrane, pa je neizvesno da li su prijavljene neželjene reakcije zaista nastale zbog oralne izloženosti Tartrazinu i drugim bojama. Opšti zaključak dosadašnjih ispitivanja je da je neophodno sprovesti široku, dobro kontrolisanu studiju sa definisanim kriterijumima kojom bi se procenili štetni efekti oralnog konzumiranja pojedinih vrsta prehrambenih azo-boja kod ljudi. Pored toga, većina studija za procenu učestalosti netolerancije na Tartrazin i druge boje su sprovedene na odabranim pacijentima sa već postojećom reakcijom netolerancije u bolničkim uslovima. Pouzdanih podataka o netoleranciji na individualne azo-boje u uslovima opšte populacije nema (Elhkim i sar., 2007).

Krajem 80-tih godina prošlog veka je sprovedeno ispitivanje reakcije na hranu koje je sadržavala smešu azo-boja kod astmatičara osetljivih na acetilsalicilnu kiselinu

(ASA) (Weber i sar., 1979). Od 43 ispitanika koji su testirani mešavinom azo-boja (Mix No 1, Amarant, Sanset žuta FCF i Ponso 4R), četiri su bila pozitivna. Kada su sva četiri subjekta ponovo testirana, na isti način tretmanom individualnim bojama, jedan pacijent je reagovao na Ponso 4R pojavom bronhokonstrikcije. Ovaj pacijent je podvrgnut kontrolisanom ispitivanju sa 20 mg Ponso 4R dva puta i u oba navrata je reagovao na isti način. Treba naglasiti da su korišćene doze Ponsa 4R kojima se vršilo izazivanje u ovim studijama od 4 do 10 puta veće od prihvatljivog dnevnog unosa (Acceptable Daily Intake, ADI – 0,7 mg / kg tm / dan).

Objavljen je veći broj studija u kojima su ispitanici bili izlagani uticaju dve ili više pojedinačnih azo-boja.

U kliničkim uslovima, ispitana je grupa od 43 dece sa angioedemom i/ili hroničnom urtikarijom. Oni su bili izlagani pojedinačnim prehrambenim bojama „skrivenim“ u neprozirnim kapsulama (Supramaniam i sar., 1986). Desetero od 36 dece je reagovalo na Sanset žutu FCF u dozi od 0,1 mg, 11 od 43 na Tartrazin u dozama od 0,1, 0,5 i 1 mg, četiri od ukupno 37 na Amarant u dozama od 0,1 mg, nijedno od 12 na karmoizin, a jedan od 43 na placebo. Reakcije su uključivale pojavu angioedema i urtikarije (n = 13), samo urtikariju (n = 11) i teško disanje (n = 4).

Ispitivanje osetljivosti na Tartrazin, Sanset žutu FCF, Ponso 4R i Eritrozin 1982. godine, uključivalo je 25 pacijenata starosti između 1,5 i 12,5 godina, sa postojećim alergijskim reakcijama na određene vrste hrane. Pacijentima je davana hrana sa pojedinačnim bojama 48 sati posle uzdržavanja od unošenja hrane koja sadrži veštačke boje (Ibero i sar., 1982). Petoro je reagovalo na Tartrazin, osmoro na Sanset žutu FCF i četvoro je reagovalo pozitivno na Ponso 4R, sve u dozama od 1 i 10 mg (5 mg za ispitanike <15 kg telesne težine za Ponso 4R). Laktoza je korišćena kao placebo. Kriterijumi za bodovanje izazivanja pozitivne reakcije bili su reprodukcija simptoma koji su doveli dete na kliniku (ponavljanje pojave urtikarije i/ili angioedema, dermo-respiratorni sindrom) ili objektivno pogoršanje već postojećeg stanja.

Rezultati ispitivanja iz 1978. godine preosetljivosti na Alura crvenu AC, Amarant, Sanset žutu FCF, Ponso 4R i Tartrazin, između ostalih boja, kod obolelih od urtikarije ili angioedema su dovedeni u pitanje jer nije bilo moguće utvrditi da li je do reakcije

netolerancije došlo zbog prehrambenih boja ili usled reakcije sa nosačem (sojino ulje) (Mikkelsen., 1978).

Poslednjih godina sve više se ispituju štetne reakcije prehrambenih boja u smeši. U ispitivanju sa „kros-over“ dizajnom sprovedenom u Koreji na 54 pacijenta sa alergijskim bolestima slučajno odabranih u pet univerzitetskih bolnica nisu uočene statistički značajne razlike između broja pacijenata koji su reagovali pozitivno na smešu aditiva u hrani i broja pacijenata koji su reagovali pozitivno na placebo (Park i sar., 2008). Posle sedam dana ishrane sa niskim sadržajem aditiva, pacijentima je davana hrana sa mešavina sedam boja ili placebo. Količina svake boje u smeši je bila 1/10 od ADI vrednosti. Kod 5 pacijenata se pojavila pozitivna reakcija na mešavinu aditiva, ali ne i reakcija na placebo, dva pacijenta su reagovali kako na aditive, tako i na placebo, tri pacijenta su reagovala samo na placebo, a kod preostala 44 pacijenta je izostala reakcija. Urtikarija, periorbitalni edem i crvenilo lica uz svrab su bili glavni simptomi.

Rezultati ispitivanja 153 dece starosti tri godine i 144 dece starosti osam i devet godina (McCann i sar., 2007) ukazuju da izlaganje mešavinama sintetičkih boja i aditiva (uključujući Karmoizin, Alura crveno, Tartrazin, Ponso 4R, Sanset žuta) uz natrijum benzoat kao konzervans povećava ukupnu hiperaktivnost (Global Hyperactivity Aggregate, GHA) u poređenju sa placebo (EFSA, 2009a,b,c,d,e).

Samo nekoliko slučajeva reakcija netolerancije na mešavine boja oralno unetih, uključujući azo-boje, je prijavljeno kod osetljivih osoba nakon ispitivanja posle ekskluzione dijete. Reakcije su urtikarija, periorbitalni edem, crvenilo lica, kao i povećanje hiperaktivnosti kod dece.

Pod pokroviteljstvom EFSA su ispitivani zdravstveni aspekti upotrebe dozvoljenih sintetičkih crvenih boja u prehrambenim proizvodima. Ova istraživanja su obuhvatala rezultate naučnih istraživanja oralnog unosa i izlaganja količinama koje odgovaraju realnom dnevnom unosu ovih boja putem hrane ili preko kozmetičkih proizvoda i sredstava za ličnu higijenu. U ovim studijama proučavani su apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje iz organizma, kao i razni toksikološki parametri (akutna oralna toksičnost, kratkotrajna i subhronična toksičnost, genotoksičnost, hronična toksičnost i karcinogenost, reproduktivna i razvojna toksičnost) i pojave hipersenzitivnosti na prisustvo ovih boja i hrani (EFSA, 2007, 2010, 2011).

EFSA (2010) donosi mišljenje koje se odnosi na sposobnost pojedinih prehrambenih azo-boja ili njihovih kombinacija da izazovu netoleranciju i/ili alergijske reakcije kod ljudi posle oralne izloženosti, uključujući i prirodu prijavljenih simptoma i rasprostranjenost takvih pojava. Uticaj azo-boja na pojavu preosetljivosti posle ekspozicije na koži se ne pominje u ovom mišljenju.

Zaključeno je da se prihvatljivi dnevni unos (ADI) nekih od ispitivanih crvenih boja mora revidirati u skladu sa novim podacima (Amarant sa 0,08 na 0,15 mg/kg tm/dan, Ponso 4R sa 0,4 na 0,7 mg/kg tm/dan, 0,1 mg/kg tm/d za crvenu 2G), dok za azorubin (ADI 4 mg/kg tm/d), Eritrozin (ADI 0,1 mg/kg tm/d) i Alura crvenu AC (ADI 7 mg/kg tm/d) nije potrebna revizija. Pored toga, zaključeno je da su maksimalni dnevni unosi ovih boja ispod ADI vrednosti, osim u nekim slučajevima (azorubin, Ponso 4R, Alura crvena AC) kod dece uzrasta od jedne do 10 godina kada može biti malo iznad gornje granice ADI. U slučaju Amaranta (boja za Amerikano i aperitivna vina) kod odraslih gornja granica ADI može biti premašena i do 6 puta. Takođe, iako je prijavljeno nekoliko slučajeva reakcija netolerancije i hipersenzitivnosti indukovanih unošenjem *per os* pojedinačnih boja u hrani, nije bilo moguće izvući pouzdan zaključak usled nedovoljnog broja jasnih dokaza. Zaključeno je da su, mnogo češće, ove pojave posledica korišćenja smeše boja u hrani, kao i da osetljive osobe mogu reagovati pri količinama boja u hrani u okviru ADI vrednosti.

Sa druge strane, zaključeno je da bi trebalo da se ažuriraju specifikacije boja u odnosu na procentualni udeo neobojenih glavnih komponenti (najčešće natrijum hlorid ili natrijum sulfat). Pošto se većina komercijalnih boja prodaje kao kompleksi aluminijuma (lakovi), koji mogu povećavati tolerisani nedeljni unos aluminijuma (Tolerable Weekly Intake, TWI 1 mg Al/kg tm nedeljno), bilo bi korisno da se u specifikaciji navede maksimalni dozvoljeni nivo aluminijuma u lakovima.

2.6. Analitičke metode za određivanje boja

Za određivanje količine prirodnih i veštačkih boja u hrani razvijen je veliki broj različitih analitičkih metoda. U literaturi se za ove svrhe navode spektrofotometrijske,

elektrohemijske i različiti vidovi hromatografskih metoda (tankoslojna hromatografija, TLC; tečna hromatografija, LC i dr.). U novijim radovima se najviše navode metode tečne hromatografije, naročito visokoefikasna tečna hromatografija, HPLC, sa različitim vrstama detektora (spektrofotometrijski, UV/VIS; sa fotodiodnim slojem, PDA; maseni detektori MS), kapilarne elektroforeze, CE i jonske hromatografije, IC (Yoshioka i Ichihashi, 2008). Ovim metodama je, navodno, moguće određivanje, dozvoljenih prirodnih i sintetičkih crvenih boja u prehrambenim proizvodima, pojedinačno ili u smeši. U najvećem broju slučajeva, navedene metode se odnose na određivanje sintetičkih boja u hrani.

Sa druge strane, većina navedenih metoda se bavi određivanjem količine boja u sokovima, bezalkoholnim i osvežavajućim napicima, alkoholnim pićima, bombonama i konditorskim proizvodima, filovima, sosovima, pecivima. Mali broj radova navodi primenu razvijenih metoda kod proizvoda od mesa. Pregledom dostupne literature, utvrđeno je da se samo tri metode konkretno odnose na određivanje boja u mesu i proizvodima od mesa (Andrzejewska, 1981.; ISO 13496:2000; Luo i sar., 2012).

U radu iz 1981. godine (Andrzejewska, 1981) se navodi da je razvijena metoda za detekciju Košenile u fino usitnjenim kobasicama tankoslojnom hromatografijom. Metoda se zasniva na izolovanju boje iz odmašćenog i homogenizovanog uzorka, adsorpciji na poliamidnoj koloni, prečišćavanju, eluiranja adsorbovane boje i određivanju metodom tankoslojne hromatografije. Ispitivana je upotreba tri različita adsorbenta (celuloza, silika gel i silika gel 60 PF₂₅₄ sa dodatim fluorescentnim indikatorom) i dve mobilne faze (kisela i bazna). Navedena granica detekcije na silika gelu 60 PF₂₅₄ je 6 µg, a na celulozi i silika gelu bez indikatora je 15 µg. Povratni prinos je oko 90 %.

ISO Standard 13496:2000 specificira metodu za detekciju sintetičkih, u vodi rastvornih, boja u proizvodima od mesa tankoslojnom hromatografijom. Ovom metodom se mogu detektovati sledeće boje: Tartrazin, hinolin žuto, Sanset žuto FCF, Amarant, Ponso 4R, Eritrozin, Patent plavo V, Indigotin, Brilijant crna PN, crna 7984, Fast zeleno FCF i plavo VRS. Izolovanje se vrši vrelom vodom iz 5 g uzorka posle odmašćivanja petrol etrom. Po izolovanju, boje se adsorbuju na poliamidnom prahu. Boje se prečišćavaju kolonskom hromatografijom, eluiraju sa kolone smešom metanol

25 % rastvor amonijum hidroksida u odnosu 95:5 (v/v). Hromatografisanje se izvodi na tankom sloju celuloze debljine 0,10 mm. Standardom su preporučene tri mobilne faze za razvijanje hromatograma sledećih sastava: a) 80 zapreminskih delova trinatrijum citratnog rastvora (2,5 g trinatrijum citrata u 1000 cm³ vode) se pomeša sa 20 zapremonskih delova 25 % rastvora amonijum hidroksida i 12 delova metanola (rastvor I); b) pomešati 6 zapreminskih delova propan-1-ola sa 1 zapreminskim delom etil acetata i 3 zapreminska dela vode (rastvor II) i c) pomešati 50 zapreminskih delova 2-metil-2-propanola sa 12 zapreminskih delova propionske kiseline i 38 zapreminskih delova vode (rastvor III). Navedeno je da neke prirodne boje, kao što su kurkumin ili šafran, mogu ometati određivanje.

Yamada i sar. (1993) koriste metilovanje Košenile diazometanom u tetrahidrofuranu za tečnehromatografsko određivanje ove boje u mlečnim proizvodima, aromama, želeima, sladoledima, kuvanoj šunci i viršlama. Razvijanje hromatograma se vrši smešom hloroform/metanol/voda na silikagelu. Prečišćavanje ekstrakta boje je vršeno na reversno-faznoj koloni za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Solid Phase Extraction, SPE). Tankoslojna hromatografija je upotrebljena za detekciju boje, dok je za kvantitativno određivanje korišćena HPLC metoda.

Voltometrija sa kapljućom živinom elektrodom je korišćena za određivanje Košenile u sladoledima i osvežavajućim, gaziranim napicima (Alghamdi i sar., 2009). Određivanje je vršeno u acetatnom puferu pH = 3, praćenjem promene potencijala redukcije boje. Pri uslovima navedenim u radu, postignuta je linearna zavisnost maksimuma električnog signala i koncentracije boje u opsegu od 5×10^{-8} do $1,25 \times 10^{-7}$ mol/l boje sa korelacionim koeficijentom od 0,99 i prosečnim povratnim prinosom od 97,9%. Druge sintetičke boje mogu ometati određivanje, naročito Sanset žuta i Eritrozin B.

Za određivanje Košenile u voćnim napicima, voćnom jogurtu i slatkišima je korišćena tečnehromatografska metoda sa spektrofotometrijskom detekcijom (Lancaster, Lawrence, 1996). Metoda je izokratska (bez promene sastava mobilne faze u toku određivanja), eluiranje je vršeno smešom metanol-6% sirćetna kiselina 40:60 (v/v), pH oko 2,8. Izolovanje i prečišćavanje je vršeno na C18 SPE kolonama. Za hromatografsko razdvajanje je korišćena C18 kolona sa 5µm sfernim česticama,

dimenzija 250×4,6 mm. Navedeno je da je granica detekcije za određivanje Košenile oko 100 ng/g (0,1 mg/kg) za različite vrste proizvoda.

Carvalho i Collins (1997) porede PDA (Photodiode Array, fotodiodni sloj) i fluorescentnu detekciju za brzo, teĥnohromatografsko određivanje Košenile u voćnom jogurtu, bezalkoholnim pićima i slatkišima. Analizirani uzorci hrane koji su sadržavali veće količine proteina su tretirani rastvrom amonijum hidroksida koncentracije 8 mol/dm³, pre hromatografisanja. Hromatografski sistem je bio smeša acetonitril/1,19 mol/dm³ mravlja kiselina 19:81 (v/v) i C18 kolona. Kvantitativno određivanje pri detekciji na fotodiodnom sloju je vršeno na 480 nm, a pri fluorescentnom određivanju za ekscitaciju je korišćena svetlost talasne dužine 470 nm, dok je emisija merena na 600 nm. Rezultati hromatografisanja sa PDA detekcijom su imali bolju preciznost, tačnost i niže granice detekcije pri ispitivanju navedenih proizvoda. Autori navode da je moguće odrediti Košenilu pored drugih prirodnih i veštačkih boja.

Za određivanje sintetičkih azo-boja, Ponsa 4R i Alura crvene AC, navedeno je više metoda za direktno određivanje u smeši ili posle razdvajanja od drugih ispitivanih supstanci. Za direktno određivanje su korišćene elektrohemijske i, mnogo češće, spektrofotometrijske metode, a od separacionih tehnika određivanja su navedene kapilarna elektroforeza, jonska hromatografija i visokoefikasna tečna hromatografija.

Diferencijalna pulsna polarografija je korišćena za analitičko određivanje tri sintetičke boje, pojedinačno ili u smeši (Azorubin, Alura crvena AC i Ponso 4R) u bezalkoholnim pićima, (Combeau i sar., 2002). Pokazano je da potencijali ispitivanih boja zavise od pH vrednosti elektrolita u kojem se vrši određivanje, kao i od njegovog sastava. Za ispitivanje su korišćeni sledeći elektroliti: fosfatni pufer (pH = 9,1), 0,1 mol/dm³ rastvor KCl i 0,01M rastvor natrijum citrata. Posle optimizacije i kalibracije, metoda je primenjena za određivanje sadržaja ispitivanih boja u sirupima, gaziranim i osvežavajućim bezalkoholnim pićima. Autori navode da je moguće da dođe do promena pH vrednosti unutar elektrohemijske ćelije kod analize napitaka sa pH nižim od 2,5, što dovodi do grešaka pri određivanju.

Tri spektrofotometrijske metode su poređene radi pronalaženja optimalnih uslova za istovremeno spektrofotometrijsko određivanje Indigotina i Ponsa 4R u instant napicima, slatkišima i želeima (Altinöz i Toptan, 2003). Za ispitivanja su korišćeni

UV/VIS spektri u opsegu talasnih dužina od 300 do 700 nm. Dobijeni opsezi linearnosti su bili od 1 do 50 µg/ml za Indigotin i od 1 do 52 µg/ml za Ponso 4R. Po autorima, navedene spektrofotometrijske metode se mogu direktno primeniti za određivanje ovih boja u ispitivanim uzorcima, a poređenjem sa HPLC metodom nije bilo statistički značajnih razlika među rezultatima.

Derivativna spektrofotometrija sa kalibracijom multivarijantnom metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS) je ispitivana u cilju razvoja brze, jeftine i pouzdane metode za istovremeno određivanje Ponsa 4R i Sanset žute FCF u želatinu u prahu (Bozdogan i sar., 2000). Razvijene su dve metode: spektrofotometrijska metoda prvog izvoda spektra i sa PLS kalibracijom. Kako navode autori, nije potrebno bilo kakvo razdvajanje boja pre određivanja. Metode su primenjene za određivanje obe boje u komercijalnom želatinu u prahu. Rezultati razvijenih metoda su poređeni i dobijeno je dobro statističko slaganje među njima.

U smešama sa Tartrazinom i Sanset žutom FCF, u želatinu i krem desertima, može se odrediti količina prisutnog Ponsa 4R spektrofotometrijskom metodom presečne tačke prvog izvoda spektra (Berzas Nevado i sar. 1998). Prema navodu autora, dobijena je linearnost do 20 mg/l za Tartrazin, do 40 mg/l za Sanset žutu i do 32 mg/l za Ponso 4R. Rezultati dobijeni ovom metodom su poređeni sa HPLC metodom koju navode autori i slaganja su bili dobra.

Za određivanje smeše tri boje je navedena spektroskopska metoda u kombinaciji sa statističkim metodama inverznih najmanjih kvadrata i regresijom analizom glavnih komponenti za hemometrijsko određivanje Tartrazina, Sanset žute i Alura crvene AC u bezalkoholnim pićima u prahu (Dinc i sar., 2002).

Analitička metoda visokoeffikasne kapilarne elektroforeze je razvijena i korišćena za određivanje osam boja u mlečnim napicima (Huang i sar., 2002). Među ispitivanim bojama su Košenila, Ponso 4R i Alura crvena AC. Razdvajanje je postignuto puferom pH 10,0 sa 7,0 mM β -ciklodekstrinom za 9 min. Prečišćavanje uzoraka za određivanje je vršeno na odgovarajućim poliamidnim kolonama za ekstrakciju na čvrstoj fazi, SPE. Kombinovanjem prečišćavanja na poliamidnim kolonama i brzog razdvajanja uspešno su određivane količine boja u mlečnim napicima. Povratni prinos osam ispitivanih boja je veći od 85%, a granica detekcije je 0,5 µg/ml.

Metoda kapilarne elektroforeze sa laserom indukovanom fluorescentnom detekcijom (Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection, CE-LIF) je primenjena za određivanje sintetičkih crvenih prehrambenih boja u sirupu i kompotu od višnje (Ryvolova i sar., 2007). Za ekscitaciju fluorescencije ispitivanih boja je korišćen Nd:YAG (Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet; Itrijum Aluminatni Granat sa dodatkom Neodijuma) diodni laser u laboratorijski napravljenom CE-LIF sistemu. Za Eritrozin B, koji ima jaku fluorescenciju, izračunata granica detekcije (odnos signal/šum, S/N = 3) je 0,4 ng/ml. Za ostale ispitivane boje kao što su karmoizin, Amarant, Ponso 4R i crvena 2G, dobijene su granice detekcije od 0,2 do 0,5 µg/ml za koje autori tvrde da su za red veličine niže nego kod kapilarne elektroforeze sa UV/VIS detekcijom. Pored toga, autori dodaju da korišćeni sistem omogućava visoku selektivnost i minimalizuje uticaj matriksa na određivanje ispitivanih boja.

Osam sintetičkih boja (Amarant, Brillijant plava, Indigo karmin, Eritrozin, Ponso 4R, Sanset žuta, Tartrazin i Alura crvena AC) je određivano visokoefikasnom jonskom hromatografijom na analitičkoj koloni sa anjonskom izmenom i sa UV/VIS detekcijom (Chen i sar., 1998). Eluiranje boja je izvršeno gradijentom mobilne faze koja se sastojala od 2 mol/dm³ rastvora hlorovodonične kiseline, acetonitrila i vode u početnom odnosu 10:50:40 (v/v). Od 9,5 do 20 minuta hromatografisanja količine rastvora hlorovodonične kiseline i vode u mobilnoj fazi su smanjene na 2,5 zapreminskih delova, a udeo acetonitrila je povećan na 95 zapreminskih delova. Od 20,1 do 35 minuta mobilna faza se sastojala od rastvora hlorovodonične kiseline i acetonitrila u odnosu 10:90 (v/v), a od 35 minuta je uspostavljen početni sastav mobilne faze. Ovakav način hromatografisanja omogućava istovremeno razdvajanje boja i regeneraciju i čišćenje analitičke kolone, što je prednost kod rutinskih analiza. Metoda je primenjena za određivanje boja u osvežavajućim bezalkoholnim, gaziranim i instant napicima. Po autorima, određivanje boja bez prethodne pripreme uzorka je glavna prednost ove metode nad visokoefikasnom tečnom hromatografijom.

Dve tečnehromatografske metode sa UV/VIS detekcijom su primenjene za pojedinačno određivanje Košenile i Ponsa 4R u finousitnjenim i grubousitnjenim barenim kobasicama (Petronijević i sar., 2009). Za izolovanje Košenile iz proizvoda je korišćena smeša 96 % rastvora etanola i 0,1 mol/dm³ hlorovodonične kiseline u odnosu

10:1 (v/v), a za ekstrakciju Ponsa 4R smeša 96 % rastvora etanola i 25 % amonijaka u istom zapreminskom odnosu. Ekstrakti su prečišćavani propuštanjem kroz poliamidne kolone. Košenila je eluirana sa kolone smešom metanola i 0,1 % trifluorsirćetne kiseline 1:1 (v/v), a Ponso 4R smešom metanola i 0,5 % amonijaka 1:1 (v/v). Količina Košenile u proizvodima je određivana metodom tečne hromatografije sa gradijentnom promenom mobilne faze u toku 15 minuta sa merenjem apsorpcije svetlosti na 494 nm. Za određivanje Ponsa 4R je primenjena izokratska tečnohromatografska metoda sa detekcijom na talasnoj dužini od 510 nm. Navedene vrednosti povratnog prinosa Košenile su od 86,48 do 107,49 %, ispitivani opseg linearnosti od 1 do 100 mg/kg sa koeficijentom determinacije od $R^2 = 0,995$. Povratni prinos Ponsa 4R je bio u intervalu od 45,62 do 102,55 % za ispitivani opseg linearnosti od 5 do 100 mg/kg ($R^2 = 0,994$). Metode su verifikovane na eksperimentalnim proizvodima fino- i grubousitnjenih barenih kobasica sa dodatim bojama.

Vrlo detaljan opis razrade i validacije metode za određivanje 14 sintetičkih boja, među kojima i Ponso 4R i Alura crvena, visokoefikasnom tečnom hromatografijom sa detekcijom na fotodiodnom sloju dat je u radu Kirschbaum-a i sar. (2003). Hromatografsko razdvajanje boja je postignuto na reversno-faznoj C18 koloni dimenzija 125×4 mm, sa veličinom čestica od 5 μ m, koristeći gradijentno eluiranje smešom acetonitril/100 mmol/dm³ natrijum acetatni pufer pH 7. Hromatografsko određivanje traje oko 70 minuta. Autori u radu ne navode konkretnu primenu metode.

Tri godine kasnije, primenjena je pomenuta metoda za određivanje boja u ribljoj ikri i kavijaru (Kirschbaum i sar., 2006) Ispitivani su postupci prečišćavanja ekstrakta boja na različitim materijalima kao što su aluminijum oksid, anjonske jonoizmenjivačke smole i poliamidni prah. Autori daju sledeći opis postupka izolovanja i prečišćavanja ekstrakta boja posle optimizovanja: ekstrakcija boja iz ikre i kavijara 1 mol/dm³ amonijačnim rastvorom, odmašćivanje n-heksanom, zakišeljavanje, adsorpcija boja na poliamidu, desorpcija smešom vodenog rastvora amonijaka i metanola i hromatografisanje po ranije opisanoj metodi (Kirschbaum i sar., 2003).

Za istovremeno određivanje u vodi rastvornih veštačkih boja – Tartrazina, Amaranta, Ponsa 4R, Sanset žute FCF i u mastima rastvornih azo boja - Sudan I, Sudan II, Sudan III i Sudan IV, razvijena je HPLC metoda sa detekcijom na fotodiodnom sloju

i masenom detekcijom sa elektrosprej jonizacijom (Ma i sar., 2006). Za izolovanje boja iz matriksa korišćen je dimetilsulfoksid (DMSO) u toku pripreme za hromatografiju. Pri masenoj detekciji, za dobijanje spektara snimani su intenziteti signala odabranih masenih jona naizmenično u pozitivnom i negativnom režimu. Na ovaj način je dobijena linearnost u opsegu od oko tri reda veličine i granice detekcije ($S/N = 3$) od 0,01-4 ng za u vodi rastvorne boje i od 0,03-11,2 ng za u mastima rastvorne veštačke boje. Povratni prinos ispitivanih boja se kretao od 93,2 do 108,3 %. Prema navodima metoda je uspešno primenjena za određivanje u vodi rastvornih boja u bezalkoholnim napicima, a sudanskih azo-boja u mlevenoj ljutoj paprici i mešavini začina sa ljutom paprikom.

Ponso 4R i Alura crvena AC su određivani visokoefikasnom tečnom hromatografijom sa fotodiodnom detekcijom (HPLC-PDA) zajedno sa još 11 veštačkih prehrambenih boja (Miniotti i sar., 2007). Za eluiranje boja je korišćena smeša acetonitril/metanol 20:80 (v/v) i 1% (m/v) rastvor amonijum acetatnog pufera pH 7,5. Boje su razdvajane i određivane na reversno-faznoj C18 koloni gradijentom mobilne faze za 29 min. Za detekciju je korišćen opseg talasnih dužina od 350 do 800 nm. Izvršena je potpuna validacija metode. Granice detekcija svih boja su u intervalu od 1,59 do 22,1 $\mu\text{g/l}$. Ponovljivost izražena kao preciznost određivanja unutar jednog dana se kretala između 0,37 % i 4,8 %, a preciznost rezultata određivanja u toku nekoliko dana se kretala od 0,86 % do 10 %. Dobijeni su rezultati povratnog prinosa od 94 % za E 142 u džemu, do 102 % za E 131 u slatkišima. Metoda je primenjena za određivanje boja u proizvodima rastvornim u vodi, kao što su pića sa voćnim aromama, alkoholna pića, džemovi, konditorski proizvodi i slatkiši, uz jednostavnu pripremu kao što je razblaživanje ili rastvaranje u vodi.

Još jedna upotreba HPLC metode sa detekcijom na fotodiodnom sloju za određivanje 40 veštačkih boja u napicima i slatkišima je navedena u novije vreme (Yoshioka i Ichihashi, 2008). Među ispitivanim bojama su Ponso 4R i Alura crvena AC. Relativno brzo određivanje, kada se ima u vidu broj ispitivanih boja, za 19 minuta, je postignuto gradijentom mobilne faze na vrlo kratkoj C18 koloni dimenzija $50 \times 4,6$ mm, sa veličinom čestica od 1,8 μm . Mobilna faza se sastojala od vodenog rastvora amonijum acetata 0,1 mol/dm³, pH 6,7, (rastvor A) i smeše acetonitril metanol u odnosu

50:50, v/v (rastvor B). Početni udeo rastvora B je bio 3 % i do 18 minuta je postepeno rastao do 60 %, a zatim održavan na 60 % u toku 2 minuta. Početni sastav mobilne faze je uspostavljen u toku 10 minuta nakon toga. Temperatura kolone u toku određivanja je 50 °C, a protok 1,5 ml/min. Autori navode povratni prinos od 76,6 % do 115 % za količinu boje od 5 µg/g matriksa, uz standardne devijacije rezultata do 6 %. Granice detekcije i granice određivanja su 0,03 i 0,1 µg/g.

Tečna hromatografija na monolitnoj C18 koloni je upotrebljena za određivanje sedam veštačkih boja, među njima i Ponso 4R, u bezalkoholnim napicima, smrznutom grašku, smrznutom povrću i bombonama (Vachirapatma i sar., 2008). Za gradijentno hromatografsko određivanje je korišćena smeša metanol/voda/acetatni pufer. Autori navode granicu detekcije za Ponso 4R, pri odnosu signala i šuma $S/N = 3$, od 2,89 µg/l. Takođe navode da je metoda uspešno primenjena za određivanje ispitivanih boja u sedam proizvoda i četiri bezalkoholna napitka.

Ubrzana ekstrakcija rastvaračima sa ultravisoko-efikasnom tečnom hromatografijom (UHPLC) je primenjena za određivanje 7 sintetičkih azo-boja u proizvodima od mesa (Luo i sar., 2012). Ispitivane su sledeće boje Tartrazin, E 102, Sanset žuta FCF, E 110, Amarant, E 123, Ponso 4R, E 124, brilijant plava FCF, E 133, Eritrozin, E 127 i Alura crvena, E 129. Ekstrakcija je vršena smešom etanol-voda-amonijak 75:24:1 (v/v/v) na ekstraktoru ASE 350, Dionex, USA, na 85 °C. Ispitivane boje su razdvajane gradijentom mobilne faze u toku 3,5 minuta. U ovom radu su navedene granice detekcije od 0,01-0,02 mg/kg i granice kvantifikacije oko 0,05 mg/kg. Metoda je validovana i dobijena je unutar-laboratorijska reproduktivnost određivanja od 1,7 % (E 123) do 5,2 % (E 124), a unutar-laboratorijska ponovljivost od 3,2 % (E 124) do 6,0 % (E 129). Vrednosti povratnog prinosa unutar jednog dana su bile u intervalu od 76,9 % (E 124) do 84,9 % (E 102), a u međudnevnim određivanjima od 76,3 % (E 124) do 84,3 % (E 127).

Pored metoda za određivanje sintetičkih boja, naveden je rad koji se bavio optimizacijom metode za izolovanje Košenile, odnosno karminske kiseline kao glavne komponente, ekstrakcijom rastvaračima na povišenom pritisku i temperaturi. Gonzalez i sar. (2002) koriste eksperimentalni dizajn sa metodom odzivne površine za optimizaciju procesa ubrzane ekstrakcije Košenile iz insekata. Za optimizaciju parametara ekstrakcije

je korišćen faktorijalni dizajn eksperimenta na dva nivoa. Ispitivani su sledeći parametri ekstrakcije: temperatura, vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa, broj ekstrakcionih ciklusa i koncentracija metanola u smeši za ekstrakciju. Dobijeni rezultati pokazuju da je broj ekstrakcija statistički najznačajniji faktor. Optimizovani sastav smeše za ekstrakciju je metanol/voda 65:35 (v/v). Razdvajanje i određivanje pigmenata u ekstraktu je vršeno visokoeffikasnom hromatografijom sa UV/VIS detekcijom.

Na osnovu pregleda podataka iz literature o metodama za određivanje boja može se sumirati:

- da ima vrlo malo analitičkih metoda koje se bave određivanjem boja u proizvodima od mesa, a da su postojeće metode zasnovane na tankoslojnoj hromatografiji;
- aktuelna metoda u standardu ISO 13496:2000(E) odnosi se na određivanje veštačkih boja, dok se metodom iz 1981. godine određuje samo Košenila u proizvodima od mesa;
- postupak pripreme i prečišćavanja uzoraka je komplikovan i nepodesan za brze, rutinske analize, a za pouzdano kvantitativno određivanje boja navedenim metodama neophodna je upotreba aplikatora, denzitometra i računarske obrade hromatograma pogodnim softverom što približava cenu opreme za tankoslojnu hromatografiju, TLC, ceni savremenih HPLC sistema;
- elektrohemijske metode omogućavaju određivanje boja direktno iz ekstrakta, posle prečišćavanja, bez prethodnog međusobnog odvajanja ispitivanih boja. Osetljivost na promene pH i moguće ometanje određivanja ispitivanih boja drugim prisutnim bojama ili srodnim jedinjenjima ograničava njihovu širu upotrebu;
- spektrofotometrijske metode su brze i jednostavne za rutinski rad, ne zahtevaju skupu i kompleksnu opremu i njima je moguće istovremeno određivanje dve ili tri boje sa apsorpcionim maksimumima na različitim talasnim dužinama u smeši. Određivanje tri crvene boje u smeši ovim metodama je diskutabilno;

- metode kapilarne elektroforeze su uspešno primenjene za određivanje boja u smeši, ali mogući problemi deformacije analitičkih pikova dovode u pitanje pouzdanost određivanja. Takođe, prisustvo proteina u supstratu predstavlja veliku smetnju. Elektroforetske metode se mogu primeniti na supstrate sa relativno niskim sadržajem proteina kao što su mleko, mlečni napici, voćni jogurt ili sladoled, ali ne postoje dokazi da je moguća njihova primena kod proizvoda od mesa;
- najveći broj metoda za određivanje boja naveden u literaturi su metode tačne hromatografije, među njima najveći broj čine metode sa detekcijom na fotodiodnom sloju. Navedene tačnohromatografske metode se bave određivanjem boja u bezalkoholnim i alkoholnim pićima, konditorskom proizvodima, slatkišima, želeu, džemovima i dr., ali se ne navodi njihova primena kod proizvoda od mesa;
- kod većine tačnohromatografskih metoda vreme trajanja instrumentalnog dela analize je nepogodno za brzo i rutinsko određivanje (oko 30 minuta i više);
- za hromatografsko razdvajanje i određivanje ispitivanih boja u većini navedenih metoda je korišćen gradijent smeše rastvarača uz upotrebu pufera u smeši;
- priprema uzoraka za hromatografiju je ili veoma kompleksna i nepogodna za rutinska određivanja ili suviše pojednostavljena (razblaživanje ili rastvaranje) da bi mogla da bude primenjena kod proizvoda od mesa;
- iako se ekstrakcija rastvaračima pri povišenom pritisku i temperaturi prvenstveno koristi za izolovanje masti i kod određivanja pesticida, ona se može primeniti za ekstrakciju boja iz supstrata koji sadrži proteine i masti posle adekvatne optimizacije postupka;
- ne postoji pouzdana, savremena metoda za određivanje prirodnih i veštačkih dodatih boja u proizvodima od mesa pogodna za redovan, rutinski rad u laboratorijama za kontrolu prisustva i sadržaja boja u ovim proizvodima.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I ZADACI RADA

3.1. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se u okviru savremenih analitičkih tehnika razviju i validuju nove metode za utvrđivanje prisustva i određivanje sadržaja prirodne boje Košenile i veštačkih boja Ponsa 4R i Alura crvene AC kod proizvoda od mesa. Istraživanje, takođe, ima za cilj da se utvrdi da li postoji međusobna zavisnost između sadržaja navedenih aditiva u proizvodima od mesa i drugih pokazatelja kvaliteta proizvoda (sastav, senzorne osobine, boja po CIE L * a * b sistemu).

Pretpostavka je da se u okviru savremene analitičke tehnike visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC), koja se, inače, široko primenjuje u različitim granama nauke i prakse, uz odgovarajuće inovacije mogu razviti nove metode za utvrđivanje prisustva i određivanje sadržaja crvenih prehrambenih boja. Za kvantitativno i kvalitativno određivanje ovih boja primenila bi se tehnika visokoefikasne tečne hromatografije sa spektrofotometrijskom detekcijom. Način ekstrahovanja boja iz proizvoda od mesa bio bi zasnovan na originalnom rešenju, koje počiva na primeni automatskog postupka ubrzane ekstrakcije boja rastvaračima.

3.2. Zadaci rada

Zadaci doktorske disertacije su:

- da se u okviru visokoefikasne tečne hromatografije sa spektrofotometrijskom detekcijom, primenom novog postupka za ekstrakciju boja, razvije i validuje nova metoda za kvantitativno i kvalitativno određivanje prirodne boje Košenile i veštačkih boja Ponsa 4R i Alura crvene AC kod proizvoda od mesa,
- da se u cilju validacije nove metode za određivanje boja izrade odgovarajući proizvodi od mesa: finousitnjena barena kobasica - „pariska kobasica“ i konzerva od mesa u komadima - „kuvana šunka“, sa količinama boja od 4,0 do 25,0

mg/kg,

- da se pomoću nove metode izvrši kvalitativno i kvantitativno određivanje Košenile, Ponsa 4R i Alura crvene AC kod eksperimentalnih proizvoda i odgovarajućih proizvoda od mesa sa tržišta,
- da se izvrši ispitivanje hemijskog sastava, fizičko-hemijskih parametara, senzorna analiza i instrumentalno ispitivanje boje CIE L*a*b kolorimetrijom eksperimentalnih proizvoda od mesa,
- da se iz rezultata CIE L*a*b kolorimetrijskih merenja i visokoeffikasne tečne hromatografije, primenom višestruke linearne regresije, razviju matematički modeli (formule) koji bi omogućili upotrebu CIE L*a*b kolorimetrije za brzo određivanje količine boja kod proizvoda od mesa, i
- da se dobijeni rezultati obrade odgovarajućim statističim metodama.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Materijal korišćen za izradu eksperimentalnog dela doktorskog rada je nabavljan od vodećih proizvođača i dobavljača hemikalija i čistih supstanci. Eksperimentalni proizvodi od mesa su izrađeni u industrijskim i u laboratorijskim uslovima na način opisan u daljem tekstu.

4.1. Rastvarači za ekstrakciju i pripremu mobilne faze za tečnu hromatografiju

Korišćeni organski rastvarači, metanol i acetonitril, su bili HPLC čistoće, CHROMASOLV, Sigma, (EU). Voda korišćena za izradu rastvora boja i puferskog rastvora je bila HPLC čistoće, JT Baker, (SAD).

4.2. Priprema rastvora amonijum acetatnog pufera

Amonijum acetat i sirćetna kiselina za pripremu rastvora pufera su bili „pro analisi“ (p.a.) čistoće, MERCK, (Nemačka). Na analitičkoj vagi je odmeravano 3,8541 g amonijum acetata, rastvarano u 800 ml HPLC vode, pH vrednost podešavana sirćetnom kiselinom uz pomoć pH-metra. Rastvor pufera je, posle podešavanja pH vrednosti, prenošen u normalni sud od 1000 ml i razblažen vodom do oznake na sudu.

4.3. Priprema zbirnog standardnog rastvora boja

Na analitičkoj vagi je odmereno po 10 mg Košenile, 10 mg Ponsa 4R i 12,5 mg Alura crvene AC (sadržaj boje 80 %) u čašu od 100 ml, rastvoreno u 50 ml vode, preneseno u normalni sud od 100 ml i razblaženo vodom do oznake suda. Koncentracija svake boje u rastvoru je iznosila 100 µg/ml. Ovaj rastvor je korišćen za pripremu radnih rastvora boja.

4.4. Izrada eksperimentalnih proizvoda od mesa

Za realizaciju ove teze izrađeni su sledeći eksperimentalni proizvodi od mesa: fino usitnjena barena kobasica, nazvana „pariska kobasica“ i konzerva od mesa u komadima, nazvana „kuvana šunka“.

4.4.1. Izrada eksperimentalne „pariske kobasice“

Eksperimentalna fino usitnjena barena kobasica izrađivana je u industrijskom pogonu, prema recepturi za „parisku kobasicu“ (tabela 2). Za izradu eksperimentalnih kobasica korišćeno je svinjsko meso II i III kategorije, juneće meso III kategorije, emulzija kožica, sojino brašno, hidrirane sojine ljuspice, led, začini i aditivi. Ukupna količina nadeva iznosila je 20 kg po svakom eksperimentalnom proizvodu.

Tabela 2 – Sirovinski sastav eksperimentalne „pariske kobasice“

Oznaka	Sirovina	Količina (kg)
1	Juneće meso III kategorije	2,63
2	Svinjsko meso II kategorije	2,26
3	Emulzija kožica	2,26
4	Hidrirane sojine ljuspice	1,88
5	Svinjsko meso III kategorije	5,64
6	Led	4,14
7	Nitritna so	0,19
8	Kuhinjska so	0,04
9	Kalijum polifosfat	0,08
10	Frisko	0,06
11	Dekstroza	0,01
12	Natrijum askorbat	0,008
13	Skrob	0,19
14	Sojino brašno	0,56
15	Začin	0,06
16	Karagenan	0,40

Proizvodne partije eksperimentalne „pariske kobasice“ su se međusobno razlikovale po vrsti i količini upotrebljenih boja. Izrađeno je 10 proizvodnih partija „pariske kobasice“, a svaka partija je posebno pripremana.

Nadev eksperimentalne „pariske kobasice“ izrađivan je u kuteru (uređaj za usitnjavanje i mešanje mesa), a zatim, dodatno, u mikrokuteru radi finog usitnjavanja i bolje homogenizacije nadeva. U toku proizvodnje eksperimentalnih fino usitnjenih barenih kobasica posebno se vodilo računa da temperatura nadeva ne pređe vrednost od 12 °C. Temperatura je kontrolisana kontaktnim bimetalnim termometrom. Nadev eksperimentalnih kobasica je punjen u poliamidne omotače prečnika 60 mm pomoću mašine za punjenje (punilica). Eksperimentalna „pariska kobasica“ je termički obrađivana pri 80 °C, do postizanja temperature od 72 °C u termalnom centru.

Eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“ su dodavane sledeće boje:

- E 120, Košenila, karminska kiselina (Cocchineal, Carminic acid);
- E 124, Ponso 4R (Ponceau 4R);
- E 129, Alura crvena AC (Allura Red AC).

Vrsta i količina boja dodatih eksperimentalnim kobasicama prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3 – Količina boje u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“.

PP ^{*)}	Boja	Količina (mg/kg)
1	Bez boje (kontrola)	0,00
2	E 120, Košenila	3,39
3	E 120, Košenila	7,50
4	E 120, Košenila	12,50
5	E 124, Ponso 4R	5,00
6	E 124, Ponso 4R	15,00
7	E 124, Ponso 4R	25,00
8	E 129, Alura crveno AC	5,00
9	E 129, Alura crveno AC	15,00
10	E 129, Alura crveno AC	25,00

^{*)}PP - proizvodna partija

Eksperimentalna „pariska kobasica“, označena brojem 1, je kontrolni proizvod bez dodatih boja. U kobasice broj 2 do 4 dodavana je Košenila (E 120) u navedenim količinama. U proizvode sa oznakom 5, 6, i 7 dodavana je boja Ponso 4R (E 124), a u proizvode pod brojem 8, 9 i 10 Alura crvena AC (E 129), kako je navedeno u tabeli 3.

4.4.2. Izrada eksperimentalne „kuvane šunke“

Eksperimentalne konzerve od mesa u komadima izrađivane su u laboratorijskim uslovima prema recepturi za „kuvanu šunku“ (tabela 4). Za izradu eksperimentalnih konzervi od mesa korišćeno je svinjsko meso I kategorije (svinjski but). Za salamurenje mesa je pripremana salamura od vode, nitritne soli, polifosfata, natrijum eritorbata (izoaskorbata) i karagenana. Ukupna količina svakog pojedinačnog eksperimentalnog proizvoda je iznosila oko 750 g. Kao i eksperimentalna „pariska kobasica“, i eksperimentalna „kuvana šunka“ se, u svakoj proizvodnoj partiji, međusobno razlikovala po vrsti i količini upotrebljenih boja. Izrađeno je 10 proizvodnih patija „kuvane šunke“, a svaka partija je pripremana posebno.

Tabela 4 – Sirovinski sastav eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

Oznaka	Sirovina	Količina (g)
1	Svinjsko meso I kategorije	500
2	Voda	192
3	Nitritna so	15,71
4	Kalijum polifosfat	3,57
5	Natrijum eritorbat	2,14
6	Karagenan	1,07

Meso za pripremu eksperimentalne „kuvane šunke“ je sečeno nožem na komade veličine oko 15 mm. Pre toga odvojeni su masni delovi i opne oko pojedinačnih mišića buta. Za svaku proizvodnu partiju odmeravano je po 500 g mesa. Salamura je pripremana rastvaranjem odmerenih količina sastojaka u vodi (tabela 4). Odnos mesa i salamure je bio 70 % prema 30 %. Meso i salamura su mešani nekoliko sati da meso potpuno „veže“ salamuru. Za mešenje je korišćen Kenwood kuhinjski robot KM 010.

Mešenje je vršeno pri najnižoj brzini. Metalne posude su ručno punjene pripremljenim sadržajem i zatvarane hermetički. Eksperimentalna „kuvana šunka“ je termički obrađivana pri 80 °C, do postizanja temperature od 72 °C u termalnom centru proizvoda.

Eksperimentalnoj „kuvanoj šunki“ dodavane su, takođe, boje:

- E 120, Košenila, karminska kiselina (Cocchineal, Carminic acid);
- E 124, Ponso 4R (Ponceau 4R);
- E 129, Alura crveno AC (Allura Red AC).

Vrsta i količina boja dodatih u „kuvanu šunku“ prikazani su u tabeli 5. Eksperimentalna „kuvana šunka“, označena brojem 1, je kontrolni proizvod bez dodatih boja. U proizvode označene brojevima 2, 3 i 4 dodavana je Košenila (E 120) u navedenim količinama. U proizvode sa oznakom 5, 6 i 7 dodavana je boja Ponso 4R (E 124), a u proizvode pod brojem 8, 9 i 10 Alura crvena AC (E 129), kako je navedeno u tabeli 5.

Tabela 5 – Količina boje u eksperimentalnoj „kuvanoj šunki“

PP ^{*)}	Boja	Količina (mg/kg)
1	Bez boje (kontrola)	0,0
2	E 120, Košenila	2,5
3	E 120, Košenila	5,0
4	E 120, Košenila	15,0
5	E 124, Ponso 4R	2,5
6	E 124, Ponso 4R	5,0
7	E 124, Ponso 4R	15,0
8	E 129, Alura crveno AC	2,5
9	E 129, Alura crveno AC	5,0
10	E 129, Alura crveno AC	15,0

^{*)}PP - proizvodna partija

4.5. Metode ispitivanja

Za ispitivanje karakteristika dobijenih eksperimentalnih proizvoda korišćene su hemijske i fizičko-hemijske metode zajedno sa ispitivanjem senzornih svojstava proizvoda. Sva ispitivanja su obavljena na Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

4.5.1. Hemijske metode ispitivanja

Od hemijskih parametara, u eksperimentalnim proizvodima od mesa izrađenim na opisani način, određivani su:

- 4.5.1.1. *sadržaj proteina*, referentnom metodom za određivanje sadržaja azota u mesu i proizvodima od mesa, SRPS ISO 937/1992, koja se zasniva na digestiji uzorka koncentrovanom sumpornom kiselinom uz korišćenje bakar sulfata kao katalizatora. Prilikom digestije organski azot se prevodi u amonijumove jone, zatim se vrši alkalizacija i destilacija oslobođenog amonijaka. Titrovanjem se određuje količina amonijaka i na kraju izračunava sadržaj azota u uzorku iz količine dobijenog amonijaka.
- 4.5.1.2. *sadržaj slobodne masti*, referentnom metodom za određivanje sadržaja slobodne masti u mesu i proizvodima od mesa, SRPS ISO 1443/1992, ekstrakcijom masti petroletrom, korišćenjem aparature po Soxhlet-u.
- 4.5.1.3. *sadržaj vlage*, referentnom metodom za određivanje sadržaja vlage u mesu i proizvodima od mesa, SRPS ISO 1442/1998, potpunim mešanjem dela uzorka za ispitivanje sa peskom i sušenjem do konstantne mase na 103 ± 2 °C.
- 4.5.1.4. *sadržaj ukupnog pepela*, metodom za određivanje ukupnog pepela u svim vrstama mesa i proizvodima od mesa, uključujući meso živine, SRPS ISO 936/1999; deo uzorka za ispitivanje se suši, ugljeniše, a zatim žari na 550 ± 25

°C. Posle hlađenja se odredi masa ostatka.

4.5.2. Fizičko-hemijske metode

Od fizičko-hemijskih osobina određivana je:

4.5.2.1. *pH vrednost*, referentnom metodom za merenje pH svih vrsta mesa i proizvoda od mesa, uključujući meso živine, SRPS ISO 2917/2004. Metoda se primenjuje na proizvode koji se mogu homogenizovati i takođe za merenja bez razaranja na mesu u trupovima, četvrtinama i mišićima. Metoda se zasniva na merenju razlike potencijala, a merenje se izvodi stavljanjem kombinovane elektrode instrumenta u uzorak mesa ili potapanjem u ekstrakt mesa ili proizvoda od mesa.

Sva ispitivanja su rađena u 6 ponavljanja.

4.5.3. Senzorsko ispitivanje boje

Kvantitativno-deskriptivnom analizom u skladu sa uputstvom o metodologiji senzorske analize, SRPS ISO 6658/2001; na skali intenziteta od 1 do 5 ocenjivana su odabrana senzorska svojstva eksperimentalnih proizvoda od mesa, i to prihvatljivost, ujednačenost boje preseka i postojanost boje 10 minuta nakon narezivanja. Ispitivanja je izvršilo šest obučanih ocenjivača. U tabeli 6 je prikazana kvantitativno deskriptivna skala koja je korišćena za ocenu senzorskih ispitivanja boje eksperimentalnih proizvoda.

Tabela 6 – Kvantitativno-deskriptivna skala za ocenu senzorskih ispitivanja boje

Brojčana ocena	Opisna ocena
5	izuzetno prihvatljiva
4	veoma prihvatljiva
3	prihvatljiva
2	na granici prihvatljivosti
1	neprihvatljiva

Za utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika među rezultatima na nivou pouzdanosti od 95% ($p < 0,05$) korišćeni su analiza varijanse (ANOVA) i Taki-Kramer test poređenja srednjih vrednosti svih parova.

4.5.4. Određivanje boje (CIE L*a*b*) kolorimetrijom

Merenja L*, a* i b* vrednosti boje preseka eksperimentalnih proizvoda po CIE L*a*b* sistemu, izvršeno je aparatom Chromameter CR-400, Konica Minolta Co. Ltd. Proizvodi su snimani posle kalibracije uređaja pri sledećim uslovima: prečnik otvora objektiva 8 mm, standardno CIE D65 difuzno osvetljenje, izvor svetlosti pulsna ksenonska lampa, ugao vidljivosti 0 stepeni. Vrednosti su merene na poprečnim presecima odmah posle narezivanja i 10 minuta nakon narezivanja, na istim presecima. Proizvodi su narezivani poprečno u odnosu na uzdužnu osu, na rastojanju od 1-2 cm tako da se dobije šest paralelnih preseka duž proizvoda.

4.5.5. Razvoj tečno-hromatografske metode za određivanje boja u proizvodima od mesa (HPLC analiza)

Vrsta i količina boja u proizvodima od mesa, određeni su reverzno-faznom visoko efikasnom tečnom hromatografijom sa ultraljubičastom (UV) detekcijom na fotodiodnom sloju. Ova analitička tehnika omogućava istovremeno razdvajanje polarnih ispitivanih supstanci (analita) od drugih prisutnih supstanci, njihovu identifikaciju na osnovu vremena zadržavanja na koloni (retencionog vremena), određivanje količine integraljenjem analitičkog signala (kvantifikaciju) i potvrdu (konfirmaciju) pomoću UV-spektra ispitivane supstance. Identifikacija, kvantifikacija i konfirmacija su moguće samo poređenjem podataka iz dobijenih hromatograma i UV-spektara sa retencionim vremenom, površinom analitičkog signala i UV-spektrom rastvora analita poznate koncentracije (standardni rastvor). Standardni rastvor može biti smeša više ispitivanih supstanci, koje se, pod uslovom da imaju različita retencionna vremena, mogu istovremeno određivati.

Metoda za određivanje boja u proizvodima od mesa je razvijana u nekoliko faza:

- a) određivanje uslova za visokoefikasnu tečnu hromatografiju;
- b) ispitivanje relevantnih činilaca za ekstrakciju boja iz proizvoda od mesa instrumentalnom tehnikom ubrzane ekstrakcije rastvaračima (Accelerated Solvent Extraction, ASE) na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku, i
- c) optimizacija uslova ekstrakcije primenom eksperimentalnog dizajna.

4.5.5.1. Određivanje uslova za tečnu hromatografiju

Sistem za tečnehromatografsko određivanje boja u proizvodima od mesa se sastojao od HPLC pumpe sa autosemplerom, injektorom i grejačem kolone WATERS Alliance 2695 Separation Module i UV-detektora sa fotodiodnim slojem WATERS 2996 Photodiode Array Detector. Ispitivan je uticaj sastava mobilne faze (smeše rastvarača za hromatografsko razdvajanje) na efikasnost razdvajanja analita. U toku ispitivanja su korišćene smeše vode i acetonitrila, vode i metanola, amonijum acetatnog pufera (pH 4) i acetonitrila, amonijum acetatnog pufera (pH 7) i acetonitrila u različitim zapreminskim odnosima komponenata za izokratsko razdvajanje. Takođe, ispitivana je efikasnost razdvajanja boja pri gradijentnom eluiranju.

Hromatografisanje je izvođeno na ambijentalnoj temperaturi, a injekciona zapremina standardnih rastvora je 10 μ l.

Detekcija je vršena u širokoj spektralnoj oblasti (od 210 do 800 nm), a zatim je korišćena automatska računrska funkcija softvera za snimanje i obradu hromatograma Empower Pro (WATERS) za pronalaženje maksimuma apsorpcije iz UV spektra i integraljenje površine pika na maksimumu apsorpcije za svaku boju (MaxPlot funkcija).

Za hromatografsko razdvajanje su korišćene dve kolone istog proizvođača (Phenomenex) Luna C18(2) i Kinetex C18 sa oktadecil sulfonatnim punjenjem. Kolone se međusobno razlikuju u materijalu kojim su napunjene (stacionarna faza). Stacionarna faza Luna kolone se sastoji od sfernih čestica od poroznog materijala, dok je kod Kinetex kolone stacionarna faza od sfernih čestica sa čvrstim jezgrom.

Cilj ove faze ispitivanja je dobijanje boljeg razdvajanja pikova analita, kao i jasno definisanih, uskih i simetričnih pikova. Dobijanjem uskih, oštih pikova povećavaju se osetljivost, tačnost i selektivnost određivanja.

4.5.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku

Ubrzana ekstrakcija boja iz proizvoda od mesa rastvaračima na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku je ispitivana na uređaju DIONEX Accelerated Solvent Extractor ASE 100. Za ekstrakciju su korišćene čelične ćelije zapremine 34 ml u koje je odmeravano po 1,00 g homogenizovanog uzorka. Ekstrakt je sakupljan u bočice za prihvatanje ekstrakta od 250 ml.

Ispitivani su sledeći faktori uticaja na efikasnost ekstrakcije:

- a) temperatura na kojoj se vrši ekstrakcija,
- b) vreme trajanja jednog ekstrakcionog ciklusa,
- c) broj ekstrakcionih ciklusa i
- d) koncentracija, u procentima, amonijum acetatnog pufera u metanolu.

Za ispitivanje uticaja ovih faktora na efikasnost izolovanja boja iz proizvoda od mesa upotrebljen je potpuni faktorski 2^k eksperimentalni dizajn (full factorial 2^k Design of Experiment, DoE), gde je k broj ispitivanih faktora. Izvedeno je 16 eksperimenata u dva ponavljanja, što čini ukupno 32 eksperimenta. Svaki faktor je praćen na dva nivoa (2 u izrazu 2^k):

- a) temperatura (T), pri vrednostima od 40 °C i 100 °C;
- b) vreme (t), 3 i 10 min;
- c) broj ciklusa (NoCy), 1 i 3;
- d) koncentracija pufera u metanolu (Cbuf), 0% (čist metanol) i 20% amonijum acetatnog pufera pH 7 u metanolu.

Na osnovu ovih vrednosti uz pomoć statističkog softverskog paketa UnscramlerX firme CamoSoft, izrađena je tabela eksperimenata (tabela 7).

Po svakoj završenoj ekstrakciji, ekstrakt iz bočice je prenet u balon sa šlifom od 100 ml, uparavan do suva na vakuum uparivaču, suvi ostatak je rastvaran u 2 ml smeše metanol/amonijum acetatni pufer pH 7 1:1 (v/v), filtriran kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm u bočicu autosemplera i hromatografski analiziran. Injekciona zapremina ekstrakta je 20 μl .

Tabela 7 –Potpuni faktorski 2^k eksperimentalni dizajn za određivanje relevantnih faktora ekstrakcije na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku

	T(°C)	t(min)	NoCy	C _{buf} (%)
1	40	3	1	0
2	100	3	1	0
3	40	10	1	0
4	100	10	1	0
5	40	3	3	0
6	100	3	3	0
7	40	10	3	0
8	100	10	3	0
9	40	3	1	20
10	100	3	1	20
11	40	10	1	20
12	100	10	1	20
13	40	3	3	20
14	100	3	3	20
15	40	10	3	20
16	100	10	3	20

U toku ispitivanja korišćen je uzorak „pariske kobasice“ bez boje kojem je dodavan standardni rastvor smeše ispitivanih crvenih prehrambenih boja tako da je količina svake boje pojedinačno iznosila 10 mg/kg. Za procenu efikasnosti izolovanja boja iz proizvoda od mesa izračunavan je povratni prinos (recovery) za svaku boju posle svakog izvedenog eksperimenta.

4.5.5.3. Optimizacija uslova ekstrakcije

Posle određivanja najbitnijih faktora uticaja na efikasnost ekstrakcije izvršena je optimizacija uslova ekstrakcije boja. Optimizacija je izvršena korišćenjem Boks-

Vilsonovog centralnog kompozitnog dizajna (skraćeno „centralni kompozitni dizajn“, CCD) za dva faktora: vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa i broj ekstrakcionih ciklusa.

Centralni kompozitni dizajn sadrži u sebi faktorski dizajn sa centralnom tačkom koji je proširen tako da omogućava dobijanje zavisnosti drugog reda (kvadratna zavisnost) izlaznih podataka od ispitivanih faktora. Rezultat centralnog kompozitnog dizajna je dvodimenzionalna funkcija (površina odziva, eng. response surface, RS) iz koje se, nalaženjem prvog izvoda, dobijaju krive zavisnosti ispitivanih podataka u funkciji ulaznih faktora. Nalaženjem maksimuma (ili minimuma) dobijenih krivih određuju se optimalne vrednosti faktora.

Centralni kompozitni dizajn za optimizaciju uslova ekstrakcije boja iz proizvoda od mesa je prikazan u tabeli 8. Prilikom dizajniranja eksperimenata za optimizaciju izabrane su minimalne i maksimalne vrednosti za vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa od 5 i 15 minuta, a za broj ekstrakcionih ciklusa od 2 i 4 (Cube od 1 do 4 u tabeli 7). Centralne vrednosti ispitivanih faktora su 10 minuta i 3 ciklusa (cp01 i cp02). Vrednosti za dizajn u obliku zvezde su zaokružljene (umesto 17,0711 i 2,9289 koliko su iznosile u originalnom dizajnu, zaokružene su na 17 i 3 minuta za vreme, a 4,4142 i 1,5858 na 4 i 2 za broj ciklusa) iz tehničkih razloga, jer se na uređaju ne mogu podesiti decimalne vrednosti vremena i broja ciklusa (Axial A i B). Eksperimenti su izvođeni bez ponavljanja osim za eksperimente centralnih vrednosti, tako da je ukupno urađeno 10 eksperimenata (4 za faktorski dizajn, 4 za dizajn u obliku zvezde i 2 za centralne vrednosti). Ponavljanje centralnih vrednosti je potrebno radi provere zakrivljenosti površine zavisnosti, odnosno provere dobijenog modela. Pri izvođenju eksperimenata za optimizaciju uslova ekstrakcije temperatura se nije menjala i iznosila je 100 °C, a, za ekstrakciju je korišćen samo metanol bez dodatog pufera.

Posle svakog izolovanja ekstrakt je pripreman za hromatografsko ispitivanje na prethodno opisan način. Injekciona zapremina ekstrakta je, takođe, 20 µl.

Kao i u odeljku 4.5.5.2., u toku ispitivanja korišćen je uzorak „pariske kobasice“ bez boje, kojem je dodavan standardni rastvor smeše ispitivanih crvenih prehrambenih boja. Takođe, za procenu efikasnosti izolovanja boja iz proizvoda od mesa, izračunavan je povratni prinos (recovery) za svaku boju posle svakog pojedinačnog eksperimenta.

Tabela 8 – Centralni kompozitni dizajn za optimizaciju ASE ekstrakcije

		Vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa (min)	Broj ekstrakcionih ciklusa
1	Axial_A(high)	17	3
2	Axial_A(low)	3	3
3	Axial_B(high)	10	5
4	Axial_B(low)	10	2
5	Cube1	5	2
6	Cube2	15	2
7	Cube3	5	4
8	Cube4	15	4
9	cp01	10	3
10	cp02	10	3

Pri ekstrakciji boja iz eksperimentalne „pariske kobasice“ pod uslovima dobijenim optimizacijom sa uzorcima kojima je dodata smeša standardnih rastvora boja („spajkovani“ uzorci) primećeno je da su rezultati povratnog prinosa određivanja sadržaja Košenile, E 120, bili niži za 30 – 40%. Radi povećanja efikasnosti ekstrakcije Košenile korišćeni su eksperimentalni proizvodi za optimizaciju uslova ubrzane ekstrakcije rastvaračima. Boks-Benkenov (Box-Behnken) dizajn sa 13 ekstrakcija (12 ekstrakcija sa različitim kombinacijama ispitivanih faktora i jedna ekstrakcija sa srednjim vrednostima svih faktora za proveru zakrivljenosti funkcije) je korišćen za optimizaciju ekstrakcionih uslova. U dizajniranju procesa optimizacije ekstrakcije boje iz eksperimentalnih kobasica su proučavani sledeći faktori:

- a) uticaj temperature ekstrakovanja u tri nivoa – 90 °C, 105 °C i 120 °C;
- b) uticaj vremena trajanja jednog ekstrakcionog ciklusa – 5, 8 i 11 minuta;
- c) uticaj broja ekstrakcionih ciklusa – 2, 3 i 4 ciklusa.

Efikasnost ekstrakcije je praćena tečnrohromatografskim određivanjem količine ekstrakovane boje izražene u µg/g uzorka i izračunavanjem povratnog prinosa. Ekstrakti su pripremani na ranije opisani način.

Faktori optimizacije i njihove vrednosti pri pojedinačnim ekstrakcijama su prikazani u tabeli 9.

Rezultati dizajna optimizacije ekstrakcije su analizirani programima za statističku obradu CAMOSOFT UnscramblerX i SAS Institute Inc. JMP 10.

Tabela 9. – Boks-Benken dizajn optimizacije ekstrakcije boje E 120 iz eksperimentalnih proizvoda

Redni broj određivanja	Temperatura (°C)	Vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa (min)	Broj ekstrakcionih ciklusa
1	90	5	3
2	90	8	2
3	90	8	4
4	90	11	3
5	105	5	2
6	105	5	4
7	105	8	3
8	105	11	2
9	105	11	4
10	120	5	3
11	120	8	2
12	120	8	4
13	120	11	3

4.5.6. Metode statističke obrade rezultata

Za tabelarno predstavljanje podataka, pripremu za dalju obradu i osnovna statistička izračunavanja je korišćen program Excell, Microsoft Office 2007, softverskog paketa sa Data Analysis dodatkom. Za kompleksnija izračunavanja, istovremenu obradu velikog broja podataka i primenu složenijih statističkih metoda su korišćeni programi za statističku obradu CAMOSOFT UnscramblerX i SAS Institute Inc. JMP 10.

Primenjene su sledeće statističke metode za obradu podataka:

- a) deskriptivna statistika za prikazivanje srednjih vrednosti rezultata, standardnih devijacija i drugih parametara u vezi sa ponovljenim određivanjima;
- b) *t*-testovi za poređenje dva seta rezultata i utvrđivanje statistički značajnih razlika među njima;

- c) analiza varijanse, ANOVA, za ispitivanje postojanja statistički značajne razlike između više setova rezultata, za analizu dizajna eksperimenta, analizu rezultata višestruke linearne regresije, odnosno proveru matematičkih modela dobijenih drugim metodama statističke obrade podataka;
- d) metoda najmanjih kvadrata za izradu matematičkih modela linearne regresije, višestruke linearne regresije i pri analizi dizajna eksperimenta;
- e) višestruka linearna regresija za utvrđivanje značajnosti uticaja ispitivanih faktora na osobine eksperimentalnih proizvoda, procesa ekstrakcije boja iz proizvoda od mesa, analizu rezultata dobijenih statističkim dizajnom eksperimenta, kao i dobijanje matematičkih modela (jednačina) za izračunavanje količine boje u proizvodima na osnovu merenja boje preseka proizvoda po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu;
- f) eksperimentalni dizajn za prikupljanje eksperimentalnih podataka pri razvoju i optimizaciji metoda ekstrakcije i hromatografskog određivanja ispitivanih boja u proizvodima od mesa.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

U ovom poglavlju su prikazani rezultati hemijskog ispitivanja eksperimentalnih proizvoda, merenja pH vrednosti, senzornog ocenjivanja, CIE L*a*b* kolorimetrije, hromatografskih ispitivanja i statističke obrade dobijeni primenom metoda navedenih u prethodnom poglavlju.

5.1. Hemijski sastav eksperimentalnih proizvoda

Rezultati hemijskog ispitivanja eksperimentalnih proizvoda od mesa su prikazani u tabelama 10 i 12. U tabeli 10 su prikazani rezultati ispitivanja hemijskog sastava „pariske kobasice“, a u tabeli 12 rezultati ispitivanja „kuvane šunke“. Kao što je ranije rečeno, ispitivani su sadržaj proteina u proizvodima, sadržaj slobodne masti, vode i pepela. Vrednosti u tabelama su prikazane kao prosek 6 ponovljenih određivanja sa odgovarajućim standardnim devijacijama. Za izračunavanje srednjih vrednosti i odstupanja dobijenih rezultata je korišćena deskriptivna statistika. Poređenje dobijenih vrednosti za ispitivani parametar (sadržaj proteina, slobodne masti, vode i pepela) je izvršeno analizom varijanse. Postojanje, odnosno odsustvo statistički značajne razlike među dobijenim rezultatima unutar serije eksperimentalnih kobasica za ispitivane komponente hemijskog sastava je obeleženo slovnim oznakama pored svakog rezultata. Između vrednosti koje su obeležene istim slovom ne postoji statistički značajna razlika pri 95 % intervalu pouzdanosti, dok različita slova znače da razlika postoji ($p < 0,05$).

5.1.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

Sadržaj proteina u ispitivanim eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“ je bio u intervalu od 11,84% do 12,77% sa vrednostima standardnih devijacija od 0,10% do 0,20%. Sadržaj masti je bio u intervalu od 12,60% do 16,80% sa vrednostima devijacija od 0,22% do 1,07%, dok je sadržaj vode u ispitivanim eksperimentalnim kobasicama bio u intervalu od 65,61% do 68,89% sa vrednostima standardnih devijacija od 0,13% do

0,58%. Interval vrednosti sadržaja pepela u eksperimentalnim kobasicama je od 2,59% do 2,75% sa vrednostima standardnih devijacija od 0,02% do 0,10%.

Tabela 10 – Hemijski sastav eksperimentalne „pariske kobasice“

PP*)	Sadržaj proteina (%)	Sadržaj slobodne masti (%)	Sadržaj vode (%)	Pepeo (%)
PK01	11,91 ± 0,12 ^b	16,50 ± 0,27 ^{ab}	65,61 ± 0,28 ^c	2,59 ± 0,10 ^c
PK02	12,62 ± 0,18 ^a	12,69 ± 0,22 ^c	67,95 ± 0,48 ^{bc}	2,69 ± 0,03 ^{abc}
PK03	12,77 ± 0,16 ^a	13,09 ± 0,24 ^c	67,72 ± 0,18 ^{bc}	2,71 ± 0,06 ^{ab}
PK04	12,58 ± 0,10 ^a	13,06 ± 0,49 ^c	67,66 ± 0,20 ^{bc}	2,66 ± 0,05 ^{abc}
PK05	11,93 ± 0,14 ^b	16,36 ± 0,44 ^{ab}	66,18 ± 0,58 ^{de}	2,67 ± 0,04 ^{abc}
PK06	12,07 ± 0,16 ^b	16,23 ± 0,71 ^{ab}	66,58 ± 0,51 ^d	2,75 ± 0,02 ^a
PK07	12,03 ± 0,12 ^b	15,52 ± 0,89 ^b	67,35 ± 0,31 ^c	2,73 ± 0,02 ^{ab}
PK08	12,75 ± 0,10 ^a	12,60 ± 0,35 ^c	68,89 ± 0,18 ^a	2,61 ± 0,03 ^c
PK09	12,10 ± 0,20 ^b	15,68 ± 1,07 ^b	68,05 ± 0,13 ^b	2,65 ± 0,07 ^{bc}
PK10	11,84 ± 0,16 ^b	16,80 ± 0,28 ^a	66,35 ± 0,21 ^d	2,68 ± 0,05 ^{abc}
Srednja vrednost	12,26	14,85	67,23	2,67

*PP - proizvodna partija

Međusobna povezanost, izražena kao stepen korelacije, hemijskih svojstava eksperimentalne „pariske kobasice“ određivana je multivarijantnim ispitivanjem rezultata. U tabeli 11 su prikazani koeficijenti korelacije ispitivanih hemijskih parametara.

Tabela 11 – Korelacija rezultata hemijskih ispitivanja eksperimentalne „pariske kobasice“

	Proteini	Mast	Voda	Pepeo
Proteini	1,0000	-0,8670	0,7251	0,0609
Mast	-0,8670	1,0000	-0,7432	0,0377
Voda	0,7251	-0,7432	1,0000	0,0061
Pepeo	0,0609	0,0377	0,0061	1,0000

Relativno visoke vrednosti stepena korelacije, preko 50 %, su utvrđene između sadržaja proteina i slobodne masti (-86,70 %), sadržaja masti i vode (-74,32 %) i sadržaja proteina i vode (72,51 %). Pri poređenju sadržaja pepela prema sadržaju ostala tri parametra dobijene su vrlo niske vrednosti stepena korelacije od 6,09 %, 3,77 % i

0,61 %, redom.

5.1.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“

Rezultati hemijskih ispitivanja konzerve „kuvana šunka“ (tabela 12) pokazuju da je sadržaj proteina u ovim proizvodima u rasponu od 15,16 % do 21,17 % sa standardnim odstupanjima od 0,10 % do 0,36 %, sadržaj masti od 0,58 % do 12,71 % sa devijacijama od 0,12 % do 0,38 % i sadržaj vode od 72,37 % do 76,60 % sa odstupanjima od 0,13 % do 0,29 %. Sadržaj pepela u ispitivanim uzorcima konzervi od mesa je bio ujednačen i kretao se u opsegu od 3,28 % do 3,51 %, dok su standardna odstupanja određivanja pepela bila od 0,20 % do 0,60 %. Varijacije u količini masti u konzervama od mesa u komadima su posledica nehomogenog sastava upotrebljenog komada mesa za izradu. Ove razlike su direktno uticale na razlike u sadržaju proteina i vode, a bile su bez uticaja na rezultate određivanja pepela.

Tabela 12 – Hemijski sastav eksperimentalne „kuvane šunke“

PP*)	Sadržaj proteina (%)	Sadržaj slobodne masti (%)	Sadržaj vode (%)	Pepeo (%)
KŠ01	15,95±0,10 ^{d,e}	5,09±0,32 ^c	75,60±0,18 ^b	3,40±0,29 ^a
KŠ02	16,36±0,19 ^{c,d}	2,69±0,12 ^f	76,60±0,29 ^a	3,41±0,30 ^a
KŠ03	16,34±0,27 ^{c,d}	2,07±0,13 ^g	76,58±0,22 ^a	3,50±0,20 ^a
KŠ04	15,86±0,36 ^e	4,86±0,19 ^c	75,46±0,22 ^b	3,42±0,21 ^a
KŠ05	15,16±0,31 ^f	12,71±0,19 ^a	72,37±0,22 ^c	3,37±0,24 ^a
KŠ06	18,47±0,13 ^b	3,94±0,22 ^d	75,00±0,13 ^c	3,51±0,60 ^a
KŠ07	16,44±0,25 ^c	3,42±0,20 ^e	76,47±0,19 ^a	3,38±0,22 ^a
KŠ08	18,73±0,32 ^c	0,85±0,21 ^h	76,26±0,14 ^a	3,30±0,23 ^a
KŠ09	15,75±0,20 ^e	5,85±0,38 ^b	73,58±0,19 ^d	3,28±0,42 ^a
KŠ10	21,17±0,13 ^a	0,58±0,31 ^h	74,64±0,14 ^c	3,30±0,17 ^a
Srednja vrednost	16,82	4,21	75,25	3,39

*)PP - proizvodna partija

Stepen korelacije hemijskih svojstava eksperimentalne „kuvane šunke“ je, kao i u slučaju „pariske kobasice“, određivan multivarijantnim ispitivanjem rezultata. U tabeli 13 su prikazani koeficijenti korelacije ispitivanih hemijskih parametara.

Pri ovom ispitivanju, relativno visoke vrednosti stepena korelacije su utvrđene između sadržaja proteina i slobodne masti (-56,04 %) i sadržaja masti i vode (-76,28 %), a vrlo niske vrednosti su dobijene između sadržaja proteina i vode (5,66 %) i sadržaja pepela prema sadržaju ostala tri parametra (-2,59 %, 1,04 % i 9,86 %).

Tabela 13 – Korelacija rezultata hemijskih ispitivanja eksperimentalne „kuvane šunke“

	Proteini	Mast	Voda	Pepeo
Proteini	1,0000	-0,5604	0,0566	-0,0259
Mast	-0,5604	1,0000	-0,7628	0,0104
Voda	0,0566	-0,7628	1,0000	0,0986
Pepeo	-0,0259	0,0104	0,0986	1,0000

5.2. Merenje pH vrednosti

U tabeli 14 su prikazane srednje pH vrednosti eksperimentalnih proizvoda od mesa, sa određenim standardnim devijacijama. Vrednosti pH „pariske kobasice“ su bile od 6,15 do 6,39, sa standardnim devijacijama od 0,01 do 0,05, a konzerve „kuvana šunka“ od 6,24 do 6,84 sa devijacijom svih rezultata od 0,01.

Tabela 14 – pH vrednost eksperimentalnih proizvoda

PP*)	pH vrednost	
	Pariska kobasica	Kuvana šunka
1.	6,38 ± 0,01 ^{ab}	6,74±0,01 ^c
2.	6,37 ± 0,01 ^{ab}	6,84±0,01 ^a
3.	6,31 ± 0,01 ^c	6,43±0,01 ^h
4.	6,39 ± 0,01 ^a	6,54±0,01 ^f
5.	6,25 ± 0,05 ^d	6,77±0,01 ^b
6.	6,36 ± 0,01 ^b	6,61±0,01 ^d
7.	6,22 ± 0,01 ^e	6,50±0,01 ^g
8.	6,22 ± 0,01 ^e	6,24±0,01 ^j
9.	6,15 ± 0,01 ^f	6,57±0,01 ^e
10.	6,23 ± 0,01 ^{de}	6,26±0,01 ⁱ

*)PP - proizvodna partija

5.3. Senzorne ocene boje eksperimentalnih proizvoda

Senzorne ocene boje eksperimentalne „pariske kobasice“ su prikazane u tabeli 15, a ocene boje preseka eksperimentalne „kuvane šunke“ date su u tabeli 17. Rezultati u tabelama su grupisani na osnovu dodatih boja. Prikazane ocene predstavljaju srednje vrednosti 6 ocena istog proizvoda za ispitivano svojstvo sa odgovarajućom standardnom devijacijom.

5.3.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

Prihvatljivost boje preseka, ujednačenost boje preseka i postojanost boje 10 minuta po narezivanju eksperimentalne barene kobasice bez dodate boje su ocenjene kao prihvatljive. Ocene su 3,00, 2,58 i 2,67 u sledu kako su navedene ispitivane karakteristike proizvoda.

Tabela 15 – Ocene senzornog ispitivanja boje eksperimentalne „pariske kobasice“

PP ^{*)}	Boja	Prihvatljivost boje preseka	Ujednačenost boje preseka	Postojanost boje preseka 10 min nakon narezivanja
PK01	Bez boje	3,00 ± 0,32	2,58 ± 0,49	2,67 ± 0,26
PK02	E120	4,50 ± 0,45 ^a	4,17 ± 0,52 ^a	4,33 ± 0,52 ^a
PK03	E120	3,83 ± 0,26 ^b	4,08 ± 0,66 ^a	3,78 ± 0,57 ^a
PK04	E120	2,77 ± 0,41 ^c	4,00 ± 0,77 ^a	2,75 ± 0,42 ^b
PK05	E124	3,67 ± 0,41 ^b	4,00 ± 0,55 ^a	3,63 ± 0,38 ^b
PK06	E124	4,42 ± 0,20 ^a	4,17 ± 0,52 ^a	4,33 ± 0,26 ^a
PK07	E124	3,80 ± 0,45 ^b	4,08 ± 0,20 ^a	3,75 ± 0,52 ^{ab}
PK08	E129	3,50 ± 0,45 ^b	4,00 ± 0,45 ^a	3,42 ± 0,38 ^b
PK09	E129	4,40 ± 0,32 ^a	4,05 ± 0,56 ^a	4,28 ± 0,51 ^a
PK10	E129	3,50 ± 0,32 ^b	4,00 ± 0,45 ^a	3,33 ± 0,26 ^b

^{*)}PP - proizvodna partija

Srednje vrednosti ocena prihvatljivosti boje preseka „pariske kobasice“ sa Košenilom su bile u intervalu od 2,77 do 3,83, sa standardnom devijacijom od 0,26 do 0,66, dok su prosečne vrednosti ocena ujednačenosti boje i postojanosti boje preseka 10 minuta nakon narezivanja iznosile od 3,83 do 4,08 za ujednačenost i od 2,75 do 3,75 za

postojanost boje preseka. Standardne devijacije ocena dobijenih pri senzorskim ispitivanjima ujednačenosti boje preseka su bile u intervalu od 0,66 do 0,82, a devijacije postojanosti boje preseka nakon 10 minuta po narezivanju su se kretale od 0,27 do 0,75.

„Pariska kobasica“ sa dodatom bojom Ponso 4R je ocenjena sledećim ocenama: prihvatljivost boje preseka od 3,25 do 3,90 sa devijacijama od 0,51 do 0,70; ujednačenost boje preseka od 2,73 do 4,17, devijacije od 0,52 do 0,95 i postojanost boje preseka 10 minuta po narezivanju od 3,17 do 3,73 sa devijacijama od 0,29 do 0,68.

„Pariska kobasica“ sa dodatom Alura crvenom je, u senzorskom ispitivanju, dobila sledeće ocene: prihvatljivost boje preseka od 3,40 do 3,75 sa standardnom devijacijom od 0,16 do 0,36, ujednačenost boje od 2,97 do 3,72 sa standardnom devijacijom od 0,25 do 0,86 i postojanost boje preseka od 3,33 do 3,62, sa standardnom devijacijom od 0,26 do 0,38.

Ocene postojanosti boje preseka senzornih svojstava „pariske kobasice“ po narezivanju i deset minuta po narezivanju su poređene dvosmernim statističkim *t*-testom. Rezultati provere postojanja statističke značajnosti razlike ocena dobijenih za prihvatljivost boje preseka odmah po narezivanju i 10 minuta nakon narezivanja su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16 – Uporedni prikaz senzornih ocena boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“ neposredno i 10 minuta posle narezivanja

PP ^{*)}	Boja	Prihvatljivost boje preseka	Postojanost boje preseka 10 min nakon narezivanja	Verovatnoća $\text{Prob}> t $
PK01	Bez boje	3,00	2,67	0,074
PK02	E 120	4,50	4,33	0,564
PK03	E 120	3,83	3,78	0,850
PK04	E 120	2,77	2,75	0,946
PK05	E 124	3,67	3,63	0,887
PK06	E 124	4,42	4,33	0,550
PK07	E 124	3,80	3,75	0,863
PK08	E 129	3,50	3,42	0,734
PK09	E 129	4,40	4,28	0,662
PK10	E 129	3,50	3,33	0,342

^{*)}PP - proizvodna partija

Sve vrednosti verovatnoće ($\text{Prob}>|t|$), kao merilo statističke značajnosti razlike poređenih rezultata, su veće od kritične vrednosti ($p>0,05$) za ispitivane senzorne ocene

eksperimentalnih proizvoda.

5.3.2. Eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

Rezultati ocenjivanja eksperimentalne „kuvane šunke“ bez boje i sa dodatim bojama su prikazani u tabeli 17.

Kod konzerve „kuvana šunka“ je ocenjivana prihvatljivost boje preseka i postojanost boje 10 minuta po narezivanju. Boja preseka konzerve od mesa bez dodate boje koja je proizvedena u laboratorijskim uslovima je ocenjena kao veoma prihvatljiva, brožčana ocena 4,42. Posle 10 minuta ocena boje je bila nešto niža, 4,33. Odmah po narezivanju, senzorske ocene proizvoda sa dodatom Košenilom su bile od 2,83 za proizvod sa količinom boje od 15 mg/kg do 4,92 za proizvod sa količinom boje od 2,5 mg/kg, a 10 minuta kasnije su se kretale od 2,83 do 4,75. Standardne devijacije ocenjivanja ovih proizvoda su bile od 0,20 do 0,26, za sveže preseke, odnosno od 0,27 do 0,41 posle stajanja.

Tabela 17 – Ocene senzornog ispitivanja boje eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

PP ^{*)}	Boja	Prihvatljivost boje preseka	Postojanost boje preseka 10 min nakon narezivanja
KŠ01	Bez boje	4,42±0,20	4,33±0,26
KŠ02	E120	4,92±0,20 ^a	4,75±0,27 ^a
KŠ03	E120	4,83±0,26 ^a	4,67±0,41 ^a
KŠ04	E120	2,83±0,26 ^b	2,83±0,41 ^b
KŠ05	E124	4,67±0,26 ^a	4,67±0,26 ^a
KŠ06	E124	4,67±0,26 ^a	4,67±0,26 ^a
KŠ07	E124	3,33±0,26 ^b	3,25±0,52 ^b
KŠ08	E129	1,92±0,20 ^c	1,83±0,26 ^c
KŠ09	E129	4,33±0,26 ^a	4,25±0,27 ^a
KŠ10	E129	3,25±0,27 ^b	3,25±0,27 ^b

^{*)}PP - proizvodna partija

Konzerva „kuvana šunka“ sa dodatom bojom Ponso 4R je dobila ocene od 3,33 do

4,67. Proizvodi sa dodatom bojom od 2,5 mg/kg i 5 mg/kg su dobili iste ocene (4,67), dok je proizvod od 15 mg/kg ponsa 4R ocenjen kao prihvatljiv (3,33). Devijacije ocena za sva tri eksperimentalna proizvoda su bile iste i iznosile su 0,26. Ocene boje preseka proizvodnih partija KŠ05 i KŠ06 su ostale nepromenjene nakon stajanja, a proizvodna partija KŠ07 je ocenjena broičano 3,25 sa standardnom devijacijom ocenjivanja od 0,52 nakon 10 minuta.

Senzorne ocene konzerve „kuvana šunka“ sa dodatom bojom Alura crvena AC su iznosile od 1,92 do 4,33. Najvišom ocenom je ocenjen proizvod sa 5 mg/kg dodate boje (4,33), dok je proizvod sa 2,5 mg/kg ocenjen „na granici prihvatljivosti“ (1,92). Standardne devijacije ocena ovih eksperimentalnih proizvoda su bile u intervalu od 0,20 do 0,27. Ocene tih proizvoda 10 minuta posle narezivanja su bile u rasponu od 1,83 do 4,25, sa standardnom devijacijom od 0,26 do 0,27.

Tabela 18 – Usporedni prikaz senzornih ocena boje preseka eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

PP ^{*)}	Boja	Prihvatljivost boje preseka	Postojanost boje preseka 10 min nakon narezivanja	Verovatnoća Prob> t
KŠ01	Bez boje	4,42	4,33	0,550
KŠ02	E 120	4,92	4,75	0,262
KŠ03	E 120	4,83	4,67	0,421
KŠ04	E 120	2,83	2,83	1,000
KŠ05	E 124	4,67	4,67	1,000
KŠ06	E 124	4,67	4,67	1,000
KŠ07	E 124	3,33	3,25	0,737
KŠ08	E 129	1,92	1,83	0,550
KŠ09	E 129	4,33	4,25	0,600
KŠ10	E 129	3,25	3,25	1,000

^{*)}PP - proizvodna partija

Rezultati ocenjivanja prihvatljivosti boje preseka odmah po narezivanju i 10 minuta nakon narezivanja su provereni dvosmernim *t*-testom radi utvrđivanja postojanja statističke značajnosti razlike ocena. Rezultati *t*-testa su prikazani u tabeli 18. Sve vrednosti verovatnoće (Prob>|t|) prikazane u tabeli su veće od kritične vrednosti ($p > 0,05$) za ispitivane senzorne ocene eksperimentalnih proizvoda, odnosno razlike nisu statistički značajne.

5.4. Rezultati kolorimetrijskih ispitivanja

CIE L*a*b* kolorimetrija, odnosno merenje boje preseka je urađeno na 6 posebnih preseka svakog eksperimentalnog proizvoda.

5.4.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

Rezultati merenja boje eksperimentalne „pariske kobasice“ bez dodate boje i sa dodatim bojama su prikazani u tabeli 19.

Srednje L*, a* i b* vrednosti eksperimentalnog proizvoda bez dodate boje su bile L* = 73,07, a* = 11,04 i b* = 13,89 odmah po narezivanju, odnosno 73,04, 11,08 i 14,07 posle 10 minuta nakon narezivanja. Za proizvode sa Košenilom iste vrednosti su bile u sledećim intervalima: L* od 69,52 do 70,81, a* od 13,60 do 17,53 i b* od 11,66 do 13,49 sa odgovarajućim standardnim devijacijama ispitivanja: od 0,32 do 0,48 za L*, od 0,26 do 0,27 za a* i 0,17 do 0,25 za b*. Za iste proizvode, ove vrednosti 10 minuta po narezivanju su bile: L* od 69,10 do 70,57, a* od 13,71 do 17,58 i b* od 11,92 do 13,70. Njihove devijacije su bile u sledećim intervalima: od 0,27 do 0,80 za L*, od 0,13 do 0,37 za a* i od 0,15 do 0,28 za b*.

Tabela 19 – L*a*b* vrednosti merenja boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“

PP ^{*)}	Po narezivanju			10 minuta posle narezivanja		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
PK01	73,07±0,34	11,04±0,23	13,89±0,18	73,04±0,16	11,08±0,28	14,07±0,16
PK02	70,81±0,48 ^a	13,60±0,27 ^c	13,49±0,23 ^a	70,57±0,80 ^a	13,71±0,37 ^c	13,70±0,16 ^a
PK03	70,80±0,39 ^a	15,50±0,27 ^b	12,96±0,25 ^b	70,47±0,31 ^a	15,38±0,18 ^b	13,17±0,15 ^b
PK04	69,52±0,32 ^b	17,53±0,26 ^a	11,66±0,17 ^c	69,10±0,27 ^b	17,58±0,13 ^a	11,92±0,28 ^c
PK05	71,33±0,41 ^a	13,19±0,99 ^c	14,26±0,24 ^a	72,47±1,03 ^a	11,53±0,94 ^c	14,44±0,20 ^a
PK06	70,82±0,43 ^a	14,78±0,92 ^b	14,29±0,43 ^a	70,59±0,40 ^a	13,42±0,47 ^b	14,73±0,17 ^a
PK07	70,14±0,09 ^b	16,27±0,15 ^a	14,55±0,11 ^a	70,39±0,47 ^a	15,83±0,62 ^a	14,84±0,26 ^a
PK08	72,14±0,26 ^a	12,43±0,17 ^c	14,15±0,40 ^a	72,02±0,13 ^a	12,37±0,54 ^c	14,17±0,42 ^a
PK09	70,90±0,21 ^b	14,90±0,22 ^b	14,36±0,45 ^a	70,91±0,26 ^b	14,75±0,26 ^b	14,42±0,27 ^a
PK10	69,78±0,20 ^c	17,50±0,20 ^a	14,56±0,51 ^a	69,66±0,31 ^c	17,45±0,32 ^a	14,67±0,12 ^a

^{*)}PP - proizvodna partija

Kod eksperimentalnih proizvoda sa dodatim Ponsom 4R vrednosti L^* , a^* i b^* su bile: L^* u opsegu od 70,14 do 71,33, a^* od 13,19 do 16,27 i b^* od 14,26 do 14,55 sa standardnim devijacijama od 0,09 do 0,43 za L^* , od 0,15 do 0,99 za a^* i 0,11 do 0,43 za b^* . Posle stajanja od 10 minuta nakon narezivanja izmerene vrednosti su bile u sledećim intervalima: L^* od 70,39 do 72,47, a^* od 11,53 do 15,83 i b^* od 14,44 do 14,84, a devijacije njihovog merenja su bile od 0,40 do 1,03 za L^* , od 0,47 do 0,94 za a^* i 0,17 do 0,26 za b^* .

Srednje vrednosti L^* eksperimentalnih proizvoda sa dodatom bojom Alura crvena AC su bile u intervalu od 69,78 do 72,14 sa standardnim odstupanjima merenja od 0,20 do 0,26, vrednosti a^* su bile od 12,43 do 17,50, odstupanja merenja su bila od 0,17 do 0,22 i vrednosti b^* su bile od 14,15 do 14,56 sa odgovarajućim odstupanjima od 0,40 do 0,51. Posle narezivanja i stajanja od 10 minuta, vrednosti su bile od 69,66 do 72,02 za L^* komponentu sa standardnom devijacijom merenja od 0,13 do 0,31, vrednosti a^* su se kretale u intervalu od 12,37 do 17,45 sa devijacijama od 0,26 do 0,54 i vrednosti b^* su bile od 14,17 do 14,67 sa standardnim devijacijama merenja ove komponente boje preseka od 0,12 do 0,42.

Tabela 20 –Poređenje L^* , a^* i b^* vrednosti preseka eksperimentalne „pariske kobasice“ neposredno po narezivanju i 10 minuta posle narezivanja

PP ^{*)}	Boja	L^*	L^* 10 min nakon narezivanja	Prob> t	a^*	a^* 10 min nakon narezivanja	Prob> t	b^*	b^* 10 min nakon narezivanja	Prob> t
PK01	Bez boje	73,07	73,04	0,841	11,04	11,08	0,803	13,89	14,07	0,093
PK02	E 120	70,81	70,57	0,541	13,60	13,71	0,574	13,49	13,70	0,106
PK03	E 120	70,80	70,47	0,139	15,50	15,38	0,401	12,96	13,17	0,105
PK04	E 120	69,52	69,10	0,035*	17,53	17,58	0,717	11,66	11,92	0,092
PK05	E 124	71,33	72,47	0,052	13,19	11,53	0,630	14,26	14,44	0,815
PK06	E 124	70,82	70,59	0,851	14,78	13,42	0,541	14,29	14,73	0,589
PK07	E 124	70,14	70,39	0,513	16,27	15,83	0,141	14,55	14,84	0,949
PK08	E 129	72,14	72,02	0,075	12,43	12,37	0,453	14,15	14,17	0,916
PK09	E 129	70,90	70,91	0,967	14,90	14,75	0,356	14,36	14,42	0,658
PK10	E 129	69,78	69,66	0,200	17,50	17,45	0,143	14,56	14,67	0,090

*PP - proizvodna partija

Ispitivano je postojanje statistički značajnog odstupanja između rezultata kolorimetrijskog merenja boje preseka odmah i 10 minuta po narezivanju. Vrednosti L^* ,

a^* i b^* su međusobno poređene za svaki uzorak. Za poređenje je korišćen dvosmerni t -test nejednakih varijansi srednjih vrednosti. Rezultati t -testa su prikazani u tabeli 20. Vrednosti verovatnoće ($\text{Prob}>|t|$) poređenja rezultata kolorimetrijskih merenja eksperimentalne „pariske kobasice“ ne pokazuju statističku značajnost osim kod proizvodne partije PK04 za vrednost L^* .

5.4.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“

Srednje vrednosti L^* , a^* i b^* komponenta 6 određivanja boje preseka konzerve „kuvana šunka“ bez boje i sa dodatkom Košenilom su prikazane u tabeli 21.

Tabela 21 – $L^*a^*b^*$ vrednosti merenja boje preseka eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

PP ^{*)}	Po narezivanju			10 minuta posle narezivanja		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
KŠ01	59,74±7,48	14,14±3,76	8,44±0,80	58,98±5,16	15,44±4,42	8,19±0,36
KŠ02	60,01±3,43 ^{ab}	14,41±1,78 ^c	6,67±0,30 ^a	58,05±4,95 ^{a,b}	14,78±2,00 ^b	6,79±0,20 ^a
KŠ03	64,23±2,08 ^a	16,82±0,84 ^b	7,82±1,39 ^a	64,40±5,78 ^a	16,16±0,64 ^b	7,38±1,89 ^a
KŠ04	56,73±3,48 ^b	21,70±1,44 ^a	6,59±2,22 ^a	56,33±2,32 ^b	21,07±1,03 ^a	8,09±2,61 ^a
KŠ05	58,15±3,60 ^a	15,05±3,42 ^b	8,35±0,53 ^a	58,63±4,63 ^a	15,64±3,53 ^a	8,51±0,64 ^a
KŠ06	60,65±4,09 ^a	16,63±2,57 ^{ab}	7,44±0,89 ^a	62,33±3,81 ^a	17,51±1,78 ^a	7,87±0,79 ^a
KŠ07	58,43±1,10 ^a	19,06±0,84 ^a	7,90±0,76 ^a	58,79±1,03 ^a	19,08±0,64 ^a	8,62±0,85 ^a
KŠ08	68,47±2,56 ^a	10,89±1,94 ^c	13,58±0,31 ^a	65,85±3,01 ^a	11,08±1,34 ^c	13,76±0,28 ^a
KŠ09	61,94±4,42 ^b	15,83±2,68 ^b	8,24±0,76 ^c	60,60±4,37 ^b	15,17±2,74 ^b	8,69±0,80 ^c
KŠ10	59,79±1,40 ^b	19,34±0,54 ^a	11,74±0,25 ^b	58,83±1,45 ^b	19,30±0,36 ^a	12,09±0,26 ^b

^{*)}PP - proizvodna partija

„Kuvana šunka“ bez boje je imala sledeće karakteristike boje preseka: svetloća, L^* , 59,74, udeo crvene boje, a^* , 14,14 i udeo žute boje, b^* , 8,44. Standardno odstupanje određivanja svetloće konzerve bez boje je iznosilo 7,48, udela crvene boje 3,76 i udela žute boje 0,80. Deset minuta po narezivanju ove vrednosti su iznosile: L^* 59,98, a^* 15,44 i b^* 8,19 sa pripadajućim devijacijama merenja 5,16 za L^* , 4,42 za a^* i 0,36 za b^* .

Konzerva „kuvana šunka“ sa dodatkom Košenilom je imala vrednosti L^* od 56,73 do

64,23 sa odstupanjima merenja od 2,08 do 3,48, a^* od 14,41 do 21,70 sa standardnim devijacijama rezultata od 0,84 do 1,78 i b^* u opsegu od 6,59 do 7,82 sa devijacijama od 0,30 do 2,22. Posle 10 minuta, komponente boje preseka su bile u intervalu: L^* od 56,33 do 64,40 sa odstupanjima merenja od 2,32 do 5,78; a^* od 14,78 do 21,07 sa odstupanjima od 0,64 do 2,00 i b^* od 6,79 do 8,09 sa odstupanjima od 0,20 do 2,61.

L^* vrednost „kuvane šunke“ sa dodatom bojom Ponso 4R se kretala od 58,15 do 60,65 sa odgovarajućim devijacijama od 1,10 do 4,09, a^* vrednost od 15,05 do 19,06, devijacije od 0,84 do 3,42 i vrednost b^* od 7,44 do 8,35 sa devijacijama 0,53 do 0,89. Merenje boje preseka 10 minuta po narezivanju je dalo sledeće rezultate: L^* od 58,63 do 62,33 sa devijacijama od 1,03 do 4,63, a^* od 15,64 do 19,08 sa devijacijama merenja boje preseka od 0,64 do 3,53 i b^* od 7,87 do 8,62 sa standardnim devijacijama od 0,64 do 0,85.

Srednje L^* vrednosti (svetloća) konzerve „kuvana šunka“ sa dodatom bojom Alura crvena AC su bile u intervalu od 59,79 do 68,47 sa standardnim odstupanjima merenja od 1,40 do 4,42, vrednosti za udeo crvene boje su bile od 10,89 do 19,34, odstupanja merenja a^* su bila od 0,54 do 2,68 i vrednosti udela žute boje su bile od 8,24 do 13,58 sa pripadajućim odstupanjima od 0,25 do 0,76. Posle narezivanja i stajanja od 10 minuta, vrednosti merenih komponenti boje preseka su imale vrednosti od 58,83 do 65,85 za L^* komponentu sa standardnom devijacijom merenja od 1,45 do 4,37, vrednosti a^* su se kretale u intervalu od 11,08 do 19,30 sa devijacijama od 0,36 do 2,74 i vrednosti b^* su bile od 8,69 do 13,76 sa relativno niskim standardnim devijacijama merenja ove komponente boje preseka od 0,26 do 0,80.

Rezultati kolorimetrijskog merenja boje preseka odmah i 10 minuta po narezivanju su statistički ispitivani da bi se utvrdilo da li postoji statistički značajna razlika među njima. Vrednosti L^* , a^* i b^* su, kao i kod eksperimentalne „pariske kobasice“, poredene za svaki uzorak. Za poređenje je korišćen dvosmerni t -test nejednakih varijansi srednjih vrednosti. Rezultati t -testa su prikazani u tabeli 22. Vrednosti verovatnoće ($\text{Prob}>|t|$) poređenja rezultata kolorimetrijskih merenja konzerve „kuvana šunka“ ne pokazuju statističku značajnost osim kod proizvodne partije KŠ10 za vrednost b^* .

Tabela 22 –Poređenje L*, a* i b* vrednosti preseka eksperimentalne „kuvane šunke“ neposredno po narezivanju i 10 minuta posle narezivanja

PP*)	Boja	L*	L* 10 min nakon narezivanja	Prob> t	a*	a* 10 min nakon narezivanja	Prob> t	b*	b* 10 min nakon narezivanja	Prob> t
KŠ01	Bez boje	59,74	58,98	0,843	14,14	15,44	0,596	8,44	8,19	0,522
KŠ02	E 120	60,01	58,05	0,447	14,41	14,78	0,744	6,67	6,79	0,437
KŠ03	E 120	64,23	64,40	0,947	16,82	16,16	0,162	7,82	7,38	0,659
KŠ04	E 120	56,73	56,33	0,821	21,70	21,07	0,407	6,59	8,09	0,309
KŠ05	E 124	58,15	58,63	0,847	15,05	15,64	0,774	8,35	8,51	0,648
KŠ06	E 124	60,65	62,33	0,447	16,63	17,51	0,508	7,44	7,87	0,401
KŠ07	E 124	58,43	58,79	0,571	19,06	19,08	0,963	7,90	8,62	0,151
KŠ08	E 129	68,47	65,85	0,136	10,89	11,08	0,850	13,58	13,76	0,317
KŠ09	E 129	61,94	60,60	0,610	15,83	15,17	0,683	8,24	8,69	0,338
KŠ10	E 129	59,79	58,83	0,268	19,34	19,30	0,871	11,74	12,09	0,039*

*PP - proizvodna partija

5.5. Razvoj tečno-hromatografske metode za određivanje boja u proizvodima od mesa (HPLC analiza)

Razvoj metode tečne hromatografije za određivanje ispitivanih boja u proizvodima od mesa je izvođen u nekoliko koraka koji su opisani u prethodnom poglavlju. Posle podešavanja metode za tečnu hromatografiju, optimizovani su uslovi izolovanja boja iz proizvoda od mesa. Dodatna podešavanja ekstrakcije boja je izvršena pomoću eksperimentalnih proizvoda.

5.5.1. Određivanje uslova za visokoeфикаsnu tečnu hromatografiju

Ispitivanjem sastava mobilne faze, brzine protoka i tehnike hromatografisanja, postavljeni su sledeći uslovi hromatografskog razdvajanja i određivanja količine boja:

Mobilna faza: acetonitril (komponenta A), amonijum acetatni pufer 50 mM pH 7 (komponenta B).

Hromatografsko razdvajanje boja je postignuto gradijentom mobilne faze. Sastav gradijenta je prikazan u tabeli 23. U prvih 12 minuta od trenutka injektovanja postepeno se povećava količina acetonitrila u mobilnoj fazi do udela od 60%. Potom se mobilna faza naglo vraća na početni sastav.

Tabela 23 – Gradijent mobilne faze pri teĥnohromatografskom odreġivanju boja

Vreme (min)	A (%)	B (%)
0,0	0	100
12,0	60	40
12,1	0	100

Optimizovana je detekcija i podešen opseg talasnih dužina od 480 do 520 nm za kvalitativno i kvantitativno odreġivanje boja u ispitivanim proizvodima. Za izdvajanje hromatograma i UV spektara boja iz podataka dobijenih detektorom sa fotodiodnim slojem korišćena je MaxPlot funkcija softvera za akviziciju i obradu hromatograma. Utvrġeno je da su maksimumi apsorpcije ispitivnih boja u mobilnoj fazi na sledećim talasnim dužinama: 494 nm za Košenilu, 508 nm za Ponso 4R i za Alura crvenu AC na 504 nm.

Ispitivanjem uticaja karakteristika materijala kojim je napunjena hromatografska kolona na razdvajanje i oblik pikova boja u hromatogramu standardnog rastvora, utvrġeno je da je pik karminske kiseline prilikom razdvajanja na Kinetex koloni bolje definisan, tj. da je uži i potpuno odvojen od ostalih pikova. Pikovi azo boja, Ponsa 4R i Alura crvene AC, se nisu značajno razlikovali pri hromatografisanju na Luna C18(2) i Kinetex C18 koloni. Takoġe, utvrġeno je da razlika u retencionim vremenima pri hromatografisanju na ovim kolonama nije značajna.

5.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku

U tabeli 24 su prikazani rezultati ispitivanja uticaja temperature, vremena trajanja i broja ponavljanja ekstrakcionih ciklusa, kao i koncentracije amonijum acetatnog pufera u metanolu na efikasnost ekstrakcije boja. Efikasnost je izražena kao povratni prinos svake boje. Vrednosti povratnog prinosa, prikazane u tabeli 24, su srednje vrednosti 2 ponavljanja i kretale su se u intervalu od 12,05% do 103,05% za Košenilu, od 37,83% do 148,72% za Ponso 4R i od 82,04% do 104,18% za Alura crvenu AC.

Tabela 24 – Povratni prinos pri ispitivanju faktora uticaja na efikasnost ekstrakcije boja za pojedinačne eksperimente

R.Br. Probe	T(°C)	t(min)	NoCy	C _{buf} (%)	R _{E120} (%)	R _{E124} (%)	R _{E129} (%)
1	40	3	1	0	13,77	48,40	91,86
2	100	3	1	0	40,11	73,89	99,15
3	40	10	1	0	12,05	37,83	88,41
4	100	10	1	0	51,52	86,16	99,91
5	40	3	3	0	14,37	45,19	93,74
6	100	3	3	0	30,61	57,42	92,69
7	40	10	3	0	19,70	68,12	103,03
8	100	10	3	0	101,98	148,72	102,10
9	40	3	1	20	44,41	53,25	82,04
10	100	3	1	20	19,65	72,03	82,64
11	40	10	1	20	17,22	66,85	87,40
12	100	10	1	20	43,70	73,96	83,29
13	40	3	3	20	31,67	77,94	94,88
14	100	3	3	20	36,56	83,09	85,48
15	40	10	3	20	65,72	116,37	104,18
16	100	10	3	20	103,05	89,92	89,31

Analizom prikazanih rezultata utvrđeni su faktori koji imaju značajan uticaj na ekstrakciju boja. Rezultati analize su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25 – Značajnost faktora ekstrakcije ispitivanih boja i njihove eksperimentalno određene vrednosti

Faktor	Značajnost			Vrednost faktora za R _{max}
	E 120	E 124	E 129	
Temperatura (°C)	***	***	N.Z.	99,83
Vreme trajanja ciklusa (min)	***	***	*	10
Broj ponavljanja ciklusa	**	***	**	3
Koncentracija pufera u metanolu (%)	N.Z.	N.Z.	**	1,02·10 ⁻¹⁴

* statistička značajnost na nivou p<0,05; ** statistička značajnost na nivou p<0,01; *** statistička značajnost na nivou p<0,001; N.Z. nema statistički značajnog uticaja.

Posmatrajući rezultate prema značajnosti za svaki ispitivani faktor pojedinačno može se zaključiti da je:

- uticaj temperature bio značajan za ekstrakciju Košenile i Ponsa 4R, dok za Alura crvenu AC nije značajno uticao na efikasnost ekstrakcije;
- vreme trajanja jednog ekstrakcionog ciklusa (static time) je značajno uticalo na

efikasnost ekstrakcije sve tri boje;

- situacija kod broja ponavljanja ekstrakcionih ciklusa je, sa stanovišta značajnosti uticaja na ekstrakciju ispitivanih boja, identična kao za vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa;
- promena koncentracije amonijum acetatnog pufera pH 7 u metanolu je imala značajan uticaj kod Alura crvene AC. Uticaj ovog faktora nije značajan za ekstrakciju na povišenom pritisku Košenile i Ponsa 4R.

5.5.3. Optimizacija ekstrakcije i kalibracija metode

U tabeli 26 su prikazani rezultati povratnog prinosa ispitivanih boja pri optimizaciji ekstrakcije iz proizvoda od mesa, sa dodatim zbirnim standardnim rastvorom Košenile, Ponsa 4R i Alura crvene AC.

Tabela 26 – Povratni prinos ispitivanih boja pri optimizaciji ekstrakcije

R.Br. Probe		Vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa (min)	Broj ekstrakcionih ciklusa	R _{E120} (%)	R _{E124} (%)	R _{E129} (%)
1	Axial_A(high)	17	3	95,73	76,35	91,57
2	Axial_A(low)	3	3	99,80	76,10	89,54
3	Axial_B(high)	10	5	106,87	104,67	109,79
4	Axial_B(low)	10	2	111,91	90,46	91,73
5	Cube1	5	2	120,86	84,74	97,50
6	Cube2	15	2	104,44	87,40	102,60
7	Cube3	5	4	97,42	99,29	95,18
8	Cube4	15	4	117,36	99,08	107,39
9	cp01	10	3	109,93	87,10	96,34
10	cp02	10	3	123,35	80,92	92,51

Ispitivani su samo faktori od značaja za efikasnost ekstrakcije sve tri boje čija je značajnost određena analizom potpunog faktorskog dizajna eksperimenta prikazanom u prethodnom odeljku, a to su vreme trajanja i broj ponavljanja ekstrakcionih ciklusa. Povratni prinos Košenile pri ovim ispitivanjima je bio u intervalu od 95,73% do 123,35%, Ponsa 4R od 76,10% do 104,67% i Alura crvene od 89,54% do 109,79%. Obradom rezultata centralnog kompozitnog dizajna određene su optimalne vrednosti

vremena trajanja i broja ponavljanja ekstrakcionih ciklusa, koje su iznosile 15 minuta i 5 ponavljanja.

Podešavanje hromatografskog sistema (kalibracija) za određivanje sadržaja ispitivanih boja u proizvodima od mesa je izvršeno ispitivanjem serije uzoraka proizvoda od mesa sa dodatim standardnim rastvorom smeše boja. Razvijene su metode obrade hromatograma radi pouzdane identifikacije boja i određivanja njihovih količina u uzorcima proizvoda od mesa. Za ova ispitivanja je korišćen proizvod od mesa koji je bio bez dodatih boja. Standardni rastvor smeše boja je dodavan u količinama od 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml i 100 µg/ml u odmerenu količinu uzorka tako da opseg merenja koncentracija boja, računato na masu uzorka, bude od 10 mg/kg, do 100 mg/kg. Na taj način su dobijeni radni opsezi kalibracione prave zavisnosti integrisane površine pika od dodate količine svake od ispitivanih boja. Jednačine kalibracionih pravih i koeficijenti determinacije su prikazani u tabeli 27.

Tabela 27 – Jednačine kalibracionih pravih i koeficijenti determinacije hromatografskog određivanja boja u proizvodima od mesa

Boja	Jednačina prave	Koeficijent determinacije, R ²
E 120, Košenila	Y = 3667,141x-19775,5	0,990
E 124, Ponso 4R	Y = 14883,59x-94351,9	0,999
E 129, Alura crvena AC	Y = 34036,33x-64199,8	0,999

Granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ) ispitivanih boja su izračunate iz rezultata validacionog postupka. Dobijene su sledeće vrednosti: LOD_{E120} = 1,05 mg/kg, LOQ_{E120} = 3,10 mg/kg; LOD_{E124} = 1,03 mg/kg, LOQ_{E124} = 3,25 mg/kg; LOD_{E129} = 0,38 mg/kg, LOQ_{E129} = 1,50 mg/kg.

Rezultati dobijeni optimizacijom ekstrakcije Košenile iz eksperimentalne “pariske kobasice” zajedno sa vrednostima faktora su prikazani u tabeli 28. Za ispitivanje je korišćena “pariska kobasica” sa 7,5 mg/kg Košenile (proizvodna partija br. 3).

Analizom dizajna procenjena je značajnost faktora ekstrakcije i određene su njihove optimalne vrednosti. Rezultati su prikazani u tabeli 29.

Od proučavanih faktora na efikasnost ekstrakcije Košenile iz eksperimentalnih barenih kobasica, statistički značajan uticaj ima promena temperature (p<0,05), dok broj

ekstrakcionih ciklusa i dužina trajanja jednog ekstrakcionog ciklusa nisu statistički značajni faktori za ekstrakciju. Optimalne vrednosti ispitivanih faktora ne mogu biti decimalni brojevi, pošto je nemoguće programirati decimalne vrednosti vremena i broja ciklusa u softveru ekstraktora, pa su dobijene vrednosti od 10,70 minuta i 3,82 ciklusa zaokružljene na 11 minuta i 4 ciklusa.

Tabela 28 – Boks-Benken dizajn optimizacije ekstrakcije boje E 120 iz eksperimentalnih proizvoda i eksperimentalno određene količine boje pri svakom eksperimentu

Redni broj određivanja	Temperatura (°C)	Vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa (min)	Broj ekstrakcionih ciklusa	Eksperimentalno određena količina E120 (µg/g)
1	90	5	3	2,566
2	90	8	2	4,060
3	90	8	4	3,721
4	90	11	3	4,976
5	105	5	2	5,020
6	105	5	4	6,285
7	105	8	3	6,564
8	105	11	2	3,574
9	105	11	4	6,665
10	120	5	3	7,019
11	120	8	2	5,898
12	120	8	4	7,100
13	120	11	3	8,587

Tabela 29 – Značajnost faktora ekstrakcije ispitivanih boja i optimalne vrednosti.

Faktor	Značajnost	Vrednost faktora
Temperatura (°C)	*	120
Vreme trajanja ciklusa (min)	N.Z.	10,70
Broj ekstrakcionih ciklusa	N.Z.	3,82

*** Statistička značajnost na nivou $p < 0,001$; ** statistička značajnost na nivou $p < 0,01$; * statistička značajnost na nivou $p < 0,05$; N.Z. nema statistički značajnog uticaja.

5.5.4. Određivanje sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima od mesa

Posle utvrđivanja optimalnih instrumentalnih uslova za hromatografsko određivanje sadržaja i optimizacije uslova ekstrakcije boja u „pariskoj kobasici“ definisan je laboratorijski postupak pripreme uzoraka za tečnehromatografsku analizu:

- a) 1 g homogenizovanog uzorka se koristi za određivanje;
- b) parametri ekstrakcije uređaja: temperatura 120°C, vreme trajanja jednog ekstrakcionog ciklusa 11 min i broj ciklusa 4;
- c) za ekstrakciju se koristi ćelija od 34 ml;
- d) ekstrakt upariti do suva na vakuum uparivaču.
- e) Rastvoriti suvi ostatak u 2 ml smeše metanol/50 mM amonijum acetatni pufer pH 7, 1:1 (v/v) i procediti kroz membranski filter prečnika pora 0,45 µm u bočice za hromatografiju od 2 ml.

Određivanje vrste i sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima visokoeffikasnom tačnom hromatografijom je urađeno u 6 ponavljanja. Izračunate su standardne devijacije određivanja, koeficijenti varijacije i povratni prinos (recovery). Rezultati određivanja boje tačnom hromatografijom kod eksperimentalnih proizvoda su prikazani u tabelama 30 i 31.

Tabela 30 – Rezultati tačnohromatografskog određivanja količine dodatih boja u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“

PP ^{*)}	Boja	Procenjena dodata koncentracija (mg/kg)	Određena koncentracija (mg/kg)	Standardna devijacija (mg/kg)	Koeficijent varijacije (%)	Povratni prinos (%)
PK01	Bez boje	-	-	-	-	-
PK02	E120	3,39	3,63	0,22	6,15	107,04
PK03	E120	7,5	7,10	0,04	0,51	94,62
PK04	E120	12,5	9,52	0,23	2,37	76,15
PK05	E124	5	5,05	0,54	10,75	101,03
PK06	E124	15	14,64	0,31	2,13	97,61
PK07	E124	25	24,74	0,41	1,68	98,95
PK08	E129	5	5,08	0,21	4,11	101,67
PK09	E129	15	15,01	0,18	1,17	100,04
PK10	E129	25	24,98	0,26	1,03	99,91

^{*)} PP – Proizvodna partija

Vrednosti povratnog prinosa Košenile u „pariskoj kobasici“ su od 76,15% do 107,04%, Ponsa 4R od 97,61% do 101,03% i Alura crvene AC od 99,91% do 101,67%. Standardne devijacije određivanja količine boja u „pariskoj kobasici“ su u intervalu od 0,04 mg/kg do 0,23 mg/kg za Košenilu, od 0,31 mg/kg do 0,54 mg/kg za Ponso 4R i od

0,18 mg/kg do 0,26 mg/kg za Alura crvenu AC.

Tabela 31– Rezultati teĥnohromatografskog odreĊivanja koliċine dodatih boja u eksperimentalnoj konzervi „kuvana ťunka“

PP ^{*)}	Boja	Procenjena dodata koncentracija (mg/kg)	OdreĊena koncentracija (mg/kg)	Standardna devijacija (mg/kg)	Koeficijent varijacije (%)	Povratni prinos (%)
KŠ01	Bez boje	-	-	-	-	-
KŠ02	E120	2,5	2,34	0,16	7,02	93,53
KŠ03	E120	5	4,82	0,18	3,73	96,43
KŠ04	E120	15	14,50	0,46	3,20	96,68
KŠ05	E124	2,5	2,45	0,20	8,08	98,13
KŠ06	E124	5	5,06	0,29	5,70	101,20
KŠ07	E124	15	14,98	0,60	4,01	99,83
KŠ08	E129	2,5	2,63	0,29	10,96	105,20
KŠ09	E129	5	5,03	0,26	5,13	100,63
KŠ10	E129	15	14,88	0,43	2,91	99,20

^{*)} PP – Proizvodna partija

Povratni prinos hromatografskog odreĊivanja koliċine ispitivanih boja u „kuvanoj ťunki“ je bio u rasponu od 93,53 % do 96,68 % sa standardnim devijacijama odreĊivanja koliċine od 0,16 do 0,46 mg/kg za Koťenilu, od 98,13 % do 101,20 % sa devijacijama od 0,20 mg/kg do 0,60 mg/kg za Ponso 4R i od 99,20 % do 105,20 % sa devijacijama od 0,26 mg/kg do 0,43 mg/kg za Alura crvenu AC.

5.5.5. Viťestruka linearna regresija rezultata CIE $L^*a^*b^*$ i teĥnohromatografskog ispitivanja eksperimentalnih barenih kobasica

Rezultati merenja boje preseka eksperimentalnih proizvoda i teĥnohromatografskog odreĊivanja sadrŹaja boje u njima su obraĊeni viťestrukom linearnom regresijom. Sumirani rezultati su prikazani u tabeli 32.

Za obradu su upotrebljeni rezultati merenja boje i hromatografskog odreĊivanja 4 eksperimentalna proizvoda, 3 sa razliċitim koliċinama boje i proizvod bez dodate boje, u ťest ponavljanja, ťto ċini ukupno 24 odreĊivanja. Vrednosti koeficijenta determinacije linearnih modela kod „pariske kobasice“ (R^2) su relativno visoke, od 0,954 za Ponso 4R do 0,993 za Alura crvenu. Kod „kuvane ťunke“ vrednosti koeficijenata determinacije

linearnih modela su niže, od 0,578 do 0,796. Niži koeficijenti determinacije znače da su modeli kod „kuvane šunke“ manje pouzdani u odnosu linearne modele kod „pariske kobasice“.

Tabela 32. –Vrednosti parametara dobijenih višestrukom regresijom rezultata CIE L* a* b* kolorimetrije i teĥnohromatografskog određivanja koliĥine boje

	Pariska kobasica			Kuvana šunka		
	E 120	E 124	E 129	E 120	E 124	E 129
R ²	0,987	0,954	0,993	0,762	0,578	0,796
Broj određivanja	24	24	24	24	24	24
	Prob> t			Prob> t		
L*	0,0491*	0,9930	0,0702	0,2009	0,0227*	0,0002*
a*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0001*	<0,0001*
b*	0,3148	0,2980	0,4894	0,0803	0,5416	0,1482

Dobijene su sledeće regresione jednaĥine:

- za barene kobasice

$$Y_{E120} = 0,39L^* + 1,77a^* + 0,28b^* - 51,78,$$

$$Y_{E124} = 0,0095L^* + 4,90a^* - 1,99b^* - 28,25 \text{ i}$$

$$Y_{E129} = -1,19L^* + 3,23a^* + 0,51b^* + 43,92,$$

- za konzerve od mesa u komadima

$$Y_{E120} = 0,21L^* + 1,37a^* - 0,80b^* - 24,18,$$

$$Y_{E124} = 0,82L^* + 1,86a^* - 0,79b^* - 66,96 \text{ i}$$

$$Y_{E129} = 0,92L^* + 2,11a^* + 0,41b^* - 88,13.$$

gde su Y_x koliĥine ispitivanih boja izraĥene u mg/kg.

Rezultati koliĥine boje u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“ dobijeni hromatografskim određivanjem i odgovarajuće vrednosti izraĥunate dobijenim jednaĥinama su prikazani u tabeli 33.

Posmatrajući rezultate *t*-testa prikazane u tabeli 33 vidi se da, za Košenilu i Alura crvenu, nema znaĥajnih odstupanja između hromatografski određene koliĥine boje u

eksperimentalnim proizvodima i količine izračunate dobijenom jednačinom (matematičkim modelom). U slučaju Ponsa 4R, postoji statistički značajna razlika između vrednosti eksperimentalno određenih količina i izračunatih po matematičkom modelu za količinu boje od 25 mg/kg. Vrednost verovatnoće koja označava postojanje statistički značajne razlike za interval pouzdanosti od 95 % je obeležena zvezdicom (*).

Tabela 33 – Količina boje u eksperimentalnim barenim kobasicama određena tačnom hromatografijom, odgovarajuće izračunate vrednosti i rezultati t-testa

PP ^{*)}	Boja	Količina boje određena HPLC (mg/kg)	Količina boje izračunata iz postavljenog modela (mg/kg)	Prob> t
PK01	Bez boje	-	0,11 ± 0,51	0,634
PK02	E120	3,63 ± 0,22	3,65 ± 0,42	0,897
PK03	E 120	7,10 ± 0,04	6,88 ± 0,38	0,204
PK04	E 120	9,52 ± 0,23	9,61 ± 0,34	0,572
PK05	E 124	5,05 ± 0,54	6,89 ± 1,85	0,059
PK06	E 124	14,64 ± 0,31	15,41 ± 2,52	0,493
PK07	E 124	24,74 ± 0,41	23,24 ± 0,67	0,002*
PK08	E 129	5,08 ± 0,21	5,66 ± 0,77	0,131
PK09	E 129	15,01 ± 0,18	14,62 ± 1,24	0,487
PK10	E 129	24,98 ± 0,26	24,99 ± 0,33	0,955

^{*)} PP – Proizvodna partija

5.5.6. Ispitivanja proizvoda sa tržišta

Razvijena tačnehromatografska metoda za određivanje boja i CIE L*a*b* kolorimetrija su primenjene za ispitivanje fino usitnjenih barenih kobasica i konzervi od mesa u komadima sa domaćeg tržišta.

Ispitana su 34 proizvoda, od toga 21 (61,76 %) su bile fino usitnjene barene kobasice (BK), a 13 (38,24 %) konzerve od mesa u komadima (KK). Od navedenih, 31 (91,18 %) su proizvodi domaćih proizvođača, a 3 (8,82 %) su iz uvoza. Ispitivani su sledeći parametri: vrsta i količina dodate boje, L*a*b* kolorimetrija i boja preseka. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 34.

Pored toga, rezultati merenja boje proizvoda sa tržišta su obrađeni matematičkim modelima opisanim u poglavlju 5.5.5. Izračunate vrednosti količine boje u proizvodima

zajedno sa eksperimentalno određenim vrednostima tečnehromatografskom metodom su, takođe, prikazane u tabeli 34.

Tabela 34. – Rezultati ispitivanja uzoraka sa tržišta

R. Br.	Vrsta proizvoda ^{a)}	CIE kolorimetrija			Prihvatljivost boje preseka	Sadržaj boje (mg/kg)		Utvrđena boja	Dekl. boja
		L*	a*	b*		HPLC	L*a*b* model		
1	BK	67,60±0,33	15,63±0,23	16,12±0,19	3,08±0,20 ^{c)}	3,35±0,16	6,76±0,34	E120	NE
2	BK	74,71±0,26	14,30±0,07	13,78±0,14	4,92±0,20	2,82±0,14	6,50±0,08	E120	NE
3	BK	75,79±2,69	13,08±1,85	11,73±0,38	4,67±0,26	3,27±0,15	4,17±2,31	E120	NE
4	BK	66,25±0,55	16,21±0,18	20,73±0,18	2,83±0,26 ^{b)}	74,95±0,63	73,32±3,81	E129	NE
5	BK	68,11±0,38	15,14±0,26	17,63±0,24	3,00±0,00 ^{b)}	42,45±0,14	41,83±3,08	E129	NE
6	BK	72,78±0,64	8,83±0,20	13,67±0,11	3,25±0,27 ^{c)}	ND ^{d)}	-3,99±0,20	Bez boje	NE
7	BK	63,97±0,46	19,29±0,13	14,92±0,09	3,25±0,27 ^{c)}	3,72±0,11	11,49±0,17	E120	NE
8	BK	69,01±0,35	15,61±0,17	12,88±0,09	4,83±0,26	3,39±0,14	6,35±0,22	E120	NE
9	BK	72,24±0,30	14,77±0,14	11,96±0,06	4,92±0,20	3,07±0,14	5,86±0,16	E120	NE
10	BK	68,63±0,53	16,57±0,05	11,98±0,18	3,58±0,49	3,98±0,15	7,65±0,21	E120	NE
11	BK	66,96±0,44	15,71±0,18	13,65±0,36	3,00±0,32 ^{b)}	3,34±0,14	5,95±0,35	E120	E120
12	BK	68,41±0,26	14,31±0,18	13,90±0,21	2,50±0,32 ^{b)}	2,44±0,16	4,10±0,29	E120	NE
13	BK	69,48±0,44	15,26±0,23	14,97±0,12	3,25±0,65 ^{b)}	19,94±0,23	18,76±2,13	E129	NE
14	BK	68,02±0,62	15,14±0,21	15,57±0,13	2,25±0,50 ^{c)}	2,87±0,13	5,89±0,76	E120	NE
15	BK	66,83±0,19	17,01±0,08	12,56±0,15	4,63±0,25	3,55±0,09	7,90±0,18	E120	E120
16	BK	71,35±0,19	14,87±0,09	13,04±0,07	4,75±0,29	2,92±0,22	5,99±0,22	E120	NE
17	BK	68,92±1,00	14,78±0,13	17,12±0,47	3,38±0,48 ^{b)}	40,38±0,52	37,33±8,17	E129	NE
18	BK	62,53±0,35	19,83±0,24	14,50±0,10	3,38±0,25 ^{b)}	4,69±0,21	11,78±0,42	E120	E120
19	BK	63,60±0,46	19,16±0,19	15,68±0,21	3,00±0,41 ^{b)}	4,32±0,15	11,33±0,21	E120	E120
20	BK	67,84±0,19	15,86±0,15	14,32±0,09	4,00±0,00	3,39±0,21	6,75±0,26	E120	NE
21	BK	68,82±0,21	15,45±0,07	14,74±0,07	4,13±0,25	3,58±0,27	6,52±0,09	E120	NE
22	KK	63,48±2,45	14,83±1,11	9,02±0,63	3,83±0,26	2,61±0,17	NP ^{e)}	E120	NE
23	KK	69,69±1,68	10,91±1,16	10,51±1,26	4,25±0,27	ND	NP	Bez boje	NE
24	KK	61,52±4,89	13,84±2,48	8,09±0,77	3,75±0,61	ND	-1,04±2,62	Bez boje	NE
25	KK	66,51±0,48	12,88±0,42	8,60±0,17	4,17±0,26	ND	NP	Bez boje	NE
26	KK	65,26±1,41	12,40±0,96	8,53±0,30	4,00±0,41	ND	NP	Bez boje	NE
27	KK	61,58±0,29	19,05±0,09	13,42±0,13	3,63±0,25	4,38±0,19	9,71±0,15	E120	NE
28	KK	74,78±0,97	4,31±0,89	11,40±0,66	2,88±0,25 ^{c)}	ND	NP	Bez boje	NE
29	KK	76,85±0,77	2,35±0,07	10,04±0,37	3,75±0,29	ND	NP	Bez boje	NE
30	KK	79,29±1,34	3,03±0,90	9,07±0,67	3,63±0,48	ND	NP	Bez boje	NE
31	KK	66,21±1,07	10,02±0,19	7,83±0,71	3,75±0,29	ND	NP	Bez boje	NE
32	KK	64,97±1,84	11,88±1,20	8,71±0,41	3,38±0,48 ^{c)}	ND	NP	Bez boje	NE
33	KK	64,23±2,61	10,35±1,54	6,52±0,67	3,75±0,29	ND	NP	Bez boje	NE
34	KK	64,84±2,37	12,60±0,96	7,02±0,54	3,88±0,25	2,91±0,30	NP	E120	E120

^{a)} BK – barena kobasica; KK – konzerva od mesa u komadima; ^{b)} boja preseka intenzivna; ^{c)} boja preseka slabo izražena; ^{d)} ND – nije detektovano prisustvo boje; ^{e)} NP – dobijeni model nije primenljiv.

Od 34 ispitana proizvoda, u 23 (67,65 %) je utvrđeno prisustvo boje, a u 11 proizvoda (32,35 %) nije potvrđeno prisustvo ovih boja. Od proizvoda sa bojom, u 19 proizvoda (82,61 %) je potvrđena Košenila, a u 4 (17,39 %) Alura crvena AC. Prisustvo

boje Ponso 4R nije utvrđeno ni u jednom od ispitivanih proizvoda.

Za 5 (14,71 %) ispitivanih proizvoda bilo je deklarirano prisustvo boje E 120 i to kod 4 fino usitnjene barene kobasice i 1 konzerve od mesa u komadima. U 18 (52,94 %) proizvoda na kojima nije deklarirana boja potvrđeno je njeno prisustvo.

Od ukupnog broja ispitanih proizvoda, za 14 (41,18 %) proizvoda je prihvatljivost boje preseka je ocenjena nižom ocenom od 3,50. Od tih proizvoda 6 (17,65 %) je imalo slabo izraženu boju preseka, a 8 (23,53 %) suviše intenzivnu boju.

6. DISKUSIJA

U ovom poglavlju doktorske disertacije biće diskutovani rezultati dobijeni primenom hemijskih, fizičko-hemijskih, senzornih metoda, metode tečne hromatografije i statističke obrade rezultata. Takođe, na osnovu prikazanih rezultata i podataka iz literature, biće iznešena zapažanja i izvedeni zaključci u vezi sa izvršenim ispitivanjima.

6.1. Hemijski sastav eksperimentalnih proizvoda

Ispitivanja hemijskog sastava eksperimentalnih proizvoda su vršena iz tri osnovna razloga:

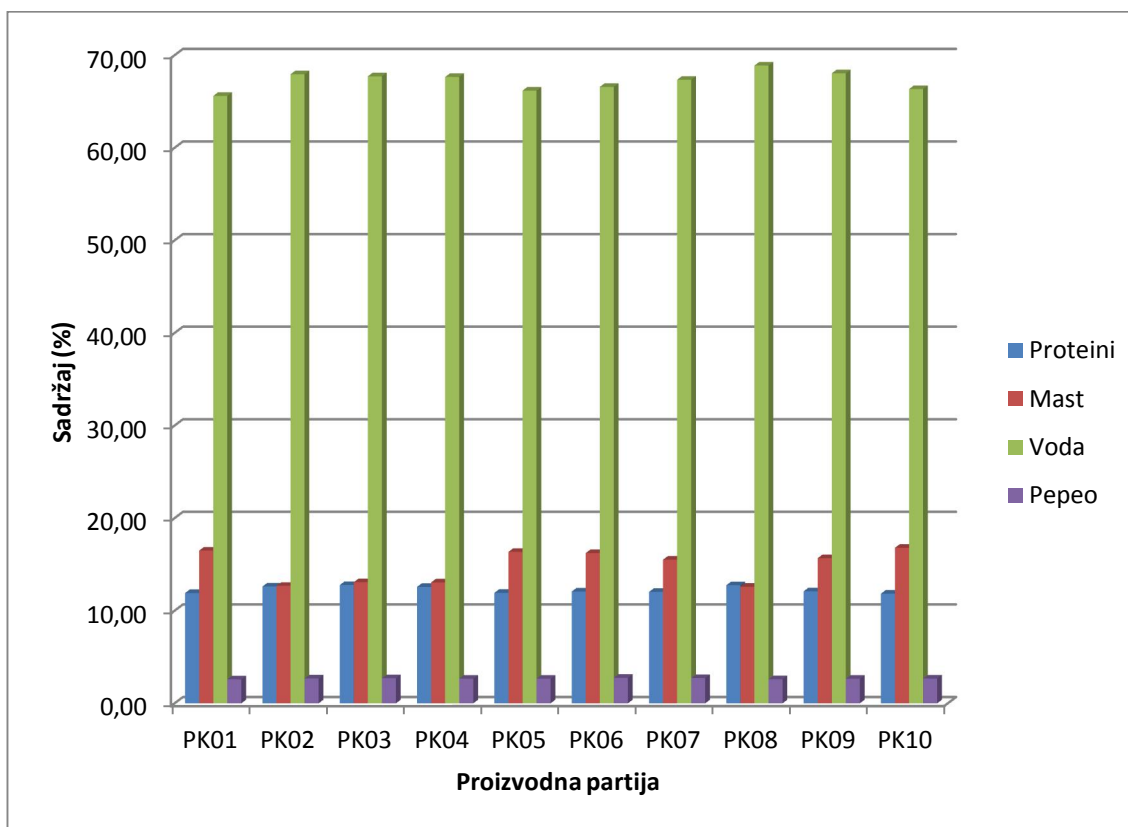
- a) da se utvrdi ujednačenost sastava, odnosno kvalitet izrade,
- b) da se ispita da li varijacije hemijskog sastava utiču na hromatografsko određivanje boja u proizvodima, i
- c) da li ovi proizvodi odgovaraju proizvodima koji se nalaze u prodaji.

6.1.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

Rezultati hemijskih ispitivanja eksperimentalne „pariske kobasice“, proizvedene u industrijskim uslovima (tabela 10) grafički su prikazani na slici 4. Iz ovih rezultata se može zaključiti da je sastav proizvodnih partija „pariske kobasice“ ujednačen. Razlika u sadržaju proteina u eksperimentalnim barenim kobasicama je oko jednog procenta (0,93 %), dok je sadržaj pepela u barenim kobasicama skoro identičan, odnosno razlika najveće (2,75 %) i najmanje vrednosti (2,59 %) sadržaja pepela je 0,16 %, što ukazuje na ujednačenost hemijskog sastava kobasica. Razlike u vrednostima sadržaja masti i vode u eksperimentalnim kobasicama su nešto veće i iznose 4,20 % za mast i 3,28 % za sadržaj vode.

Multivarijantnom analizom je ispitivano postojanje korelacije između sadržaja proteina, masti, vode i pepela u eksperimentalnim kobasicama. Promena količine jednog parametra hemijskog sastava proizvoda može uticati, pozitivno ili negativno, na jedan

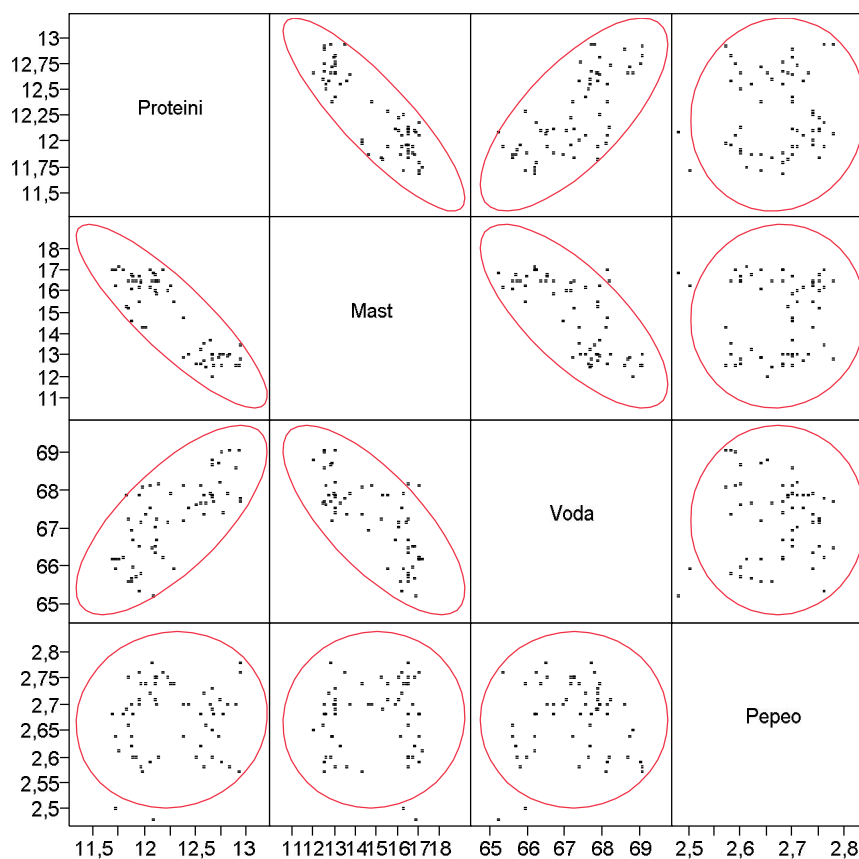
ili više drugih parametara. Stoga je bilo neophodno utvrditi na koji način i u kojoj meri su ispitivani hemijski parametri međusobno povezani. Rezultati multivarijantne analize su grafički prikazani na slici 5.



Slika 4 – Rezultati ispitivanja hemijskih svojstava eksperimentalne „pariske kobasice“

Elipse opisane oko tačaka u grafičkom prikazu rezultata multivarijantnog ispitivanja hemijskih svojstava eksperimentalnih barenih kobasica predstavljaju intervale pouzdanosti odgovarajućih parametara na nivou od 95 %. Oblik elipse ukazuje na postojanje ili nepostojanje korelacije između ispitivanih podataka. Ako se elipsa približava kružnom obliku, stepen korelacije je vrlo nizak, a ako je elipsa izduženija, to je zavisnost među ispitivanim podacima veća. Sa druge strane, ako duža osa elipse ima uzlaznu putanju (od levog donjeg ugla grafika ka desnom gornjem uglu), podaci koji se porede su direktno proporcionalni, odnosno sa porastom vrednosti jedne veličine rastu vrednosti druge ispitivane veličine. U slučaju da uzdužna osa elipse ima smer od levog gornjeg ugla ka desnom donjem uglu grafika, reč je o obrnutoj proporcionalnosti, kada

vrednosti jedne veličine rastu vrednosti druge uporedne veličine opadaju. Nagib ovih osa je, zapravo, stepen korelacije ispitivanih veličina i, u slučaju direktne proporcionalnosti ima pozitivan, a u slučaju obrnute proporcionalnosti ima negativan predznak.



Slika 5 – Korelacija rezultata hemijskih svojstava eksperimentalne „pariske kobasice“

Na osnovu izloženog, posmatrajući rezultate multivarijantne analize hemijskih parametara eksperimentalne „pariske kobasice“, proizilazi da:

- sadržaj proteina je direktno proporcionalan sadržaju vode i stepen korelacije je relativno visok, 72,51 %;
- obrnuta proporcionalnost postoji između sadržaja proteina i sadržaja slobodne masti u kobasicama. Stepen korelacije je negativan i vrlo visok i iznosi -86,70 %;
- stepen korelacije sadržaja vode i sadržaja masti je relativno visok i sa negativnim

predznakom (obrnuta proporcionalnost) i iznosi -74,32 %;

- vrednosti stepena korelacije sadržaja pepela prema sadržaju proteina, masti i vode su vrlo niske (6,1 %, 3,8 % i 0,6 %), pa se može reći da sadržaj pepela nije u korelaciji ni sa jednim od prethodno navedenih hemijskih parametara.

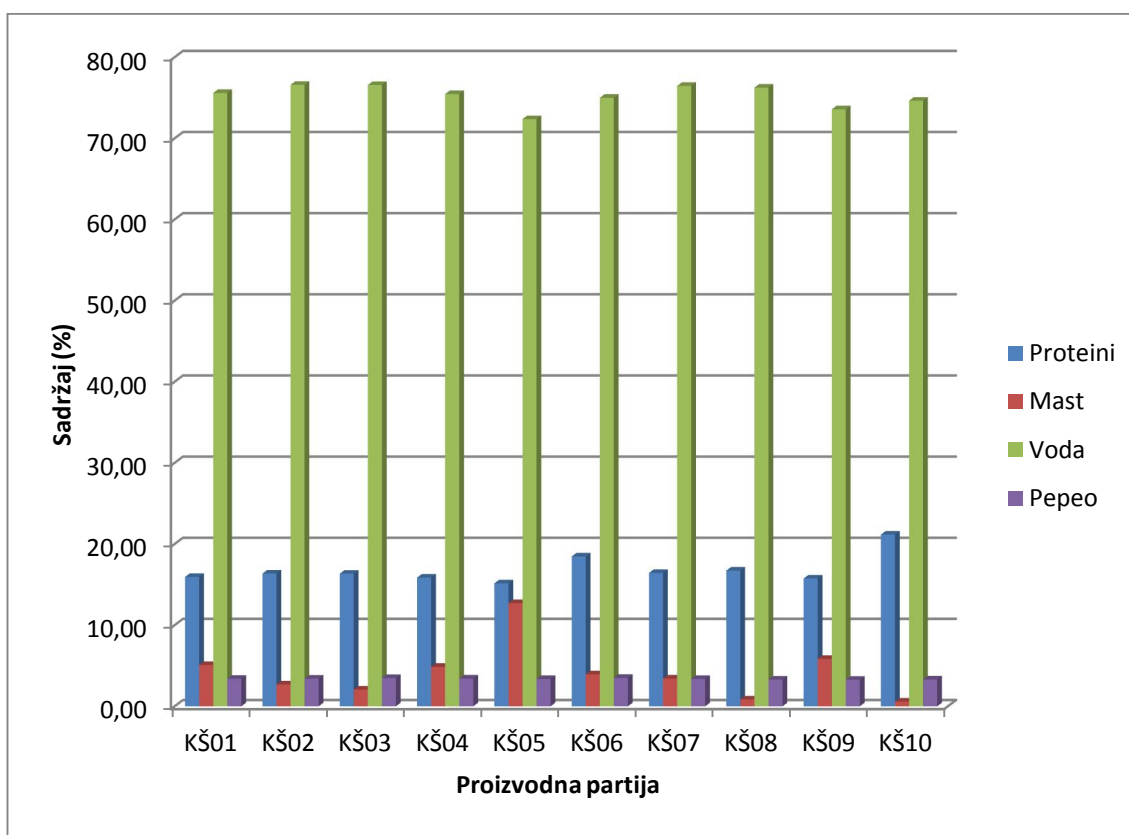
Sadržaj vode u „pariskoj kobasici“ je relativno visok, od 65,61 % do 68,89 %, dok su vrednosti za sadržaj slobodne masti niže od očekivanih za ovu vrstu proizvoda od mesa, od 12,60 % do 16,80 %. Sadržaj proteina u svim proizvodnim partijama eksperimentalne „pariske kobasice“ je veći od 10 %, što je u skladu sa Pravilnikom o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, “Sl. glasnik RS”, br. 31/2012).

6.1.2. Eksperimentalna „kuvana šunka“

Kao i kod eksperimentalne „pariske kobasice“, tako i kod eksperimentalne „kuvane šunke“, ispitivani su hemijski pokazatelji kvaliteta (sadržaj proteina, slobodne masti, vode i pepela) radi provere ujednačenosti sastava proizvoda. Za ispitivanja su korišćene iste referentne metode.

Rezultati prikazani u prethodnom poglavlju u tabeli 12 su grafički predstavljani na slici 6.

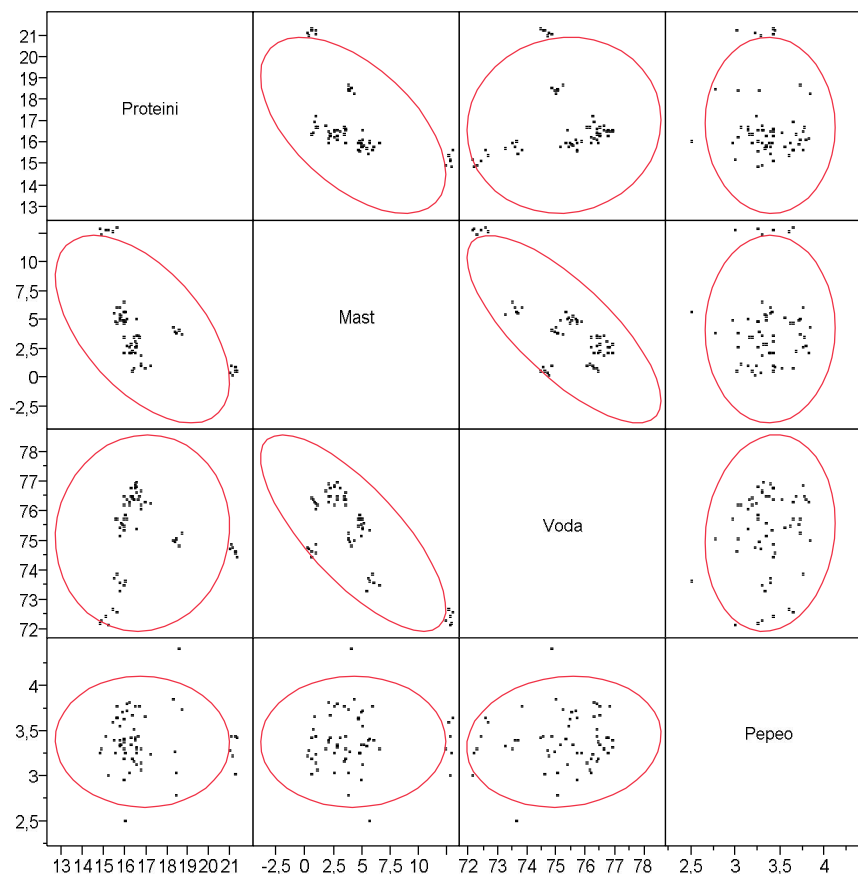
Poređenje rezultata hemijskih svojstava eksperimentalne „kuvane šunke“ pokazuje da je sastav proizvoda relativno ujednačen, uz sledeća odstupanja: sadržaj masti u proizvodu broj 5 je veći nego kod ostalih proizvoda (12,71 %), sadržaj proteina u proizvodu broj 10 je povećan u odnosu na ostale proizvode (21,17 %), dok je sadržaj masti u proizvodnim partijama broj 8 i 10 veoma nizak (manji od jednog procenta). Navedene razlike su statistički značajne, što je utvrđeno analizom varijanse, a posledica su nedovoljno ujednačenog sastava upotrebljenog mesa za izradu eksperimentalnih konzervi od mesa u laboratorijskim uslovima. Imajući u vidu količine, prirodu sirovine za izradu i recepturu, kao i da su eksperimentalni proizvodi pripremani u laboratorijskim uslovima, jasno je da su ovakva odstupanja u sastavu uobičajena pojava.



Slika 6 – Rezultati ispitivanja hemijskih svojstava eksperimentalne „kuvane šunke“

Rezultati hemijskog ispitivanja sadržaja pepela u eksperimentalnoj „kuvanoj šunki“, slično kao kod barenih kobasica, vrlo su ujednačeni, razlika najviše i najniže vrednosti je 0,23 % i približna je prosečnoj standardnoj devijaciji određivanja sadržaja pepela kod ove serije proizvoda.

Multivarijantno ispitivanje rezultata hemijskog sastava eksperimentalne „kuvane šunke“ pokazuje nešto drukčiju sliku nego kod eksperimentalne „pariske kobasice“ (slika 7). Na razlike u sastavu eksperimentalne „kuvane šunke“ najviše su uticali međusobni odnosi sadržaja proteina i slobodne masti (stepen korelacije -56,04 %) i sadržaja slobodne masti i vode (-76,28 %). Sadržaj proteina i vode, kao i odnos sadržaja pepela prema sadržaju proteina, masti i vode ne pokazuju postojanje značajne korelacije, pa samim tim nisu uticali na razlike hemijskog sastava eksperimentalnih konzervi od mesa u komadima.



Slika 7 –Multivarijantno ispitivanje rezultata hemijskih svojstava eksperimentalne „kuvane šunke“

Na osnovu prikazanih rezultata hemijskih ispitivanja, može se zaključiti da eksperimentalni proizvodi imaju zadovoljavajuću ujednačenost sastava, da po hemijskim karakteristikama odgovaraju proizvodima koji se nalaze na tržištu i da razlike u sadržaju proteina, masti vode i pepela, kao što će biti pokazano kasnije, ne ometaju određivanje količine boja u eksperimentalnim proizvodima.

6.2. pH vrednost eksperimentalnih proizvoda

Merenje pH vrednosti je jedan od važnijih pokazatelja kvaliteta mesa i proizvoda od mesa. Promene pH vrednosti su posledica promena u mišićima koje nastaju posle klanja

životinje. Uobičajene pH vrednosti barenih kobasica i kuvane šunke u konzervi se nalaze u opsegu od 6,0 do 6,5 (Puolanne i sar., 2001).

Srednje vrednosti pH, na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 14 su 6,29 kod eksperimentalne „pariske kobasice“ i 6,55 kod „kuvane šunke“. Na pH vrednost konzerve „kuvana šunka“ u znatnoj meri utiče i salamura koja je korišćena za pripremu ovih proizvoda. U sastavu salamure, kao što je navedeno u recepturi, nalaze se polifosfati i eritorbat koji, u vodenim rastvorima, imaju pH vrednost veću od 7,0, odnosno daju slabo bazne rastvore. Kada se ima u vidu da salamura čini 30 % gotovog proizvoda, jasno je da pH vrednost ovih proizvoda mora biti viša od pH vrednosti „pariske kobasice“.

Rezultati pH vrednosti potvrđuju da su eksperimentalni proizvodi na zadovoljavajućem nivou kvaliteta i da se mogu koristiti kao reprezentativni uzorci za dalja ispitivanja koja su sprovedena pri izradi ove teze. Izmerene pH vrednosti su okvirima prihvatljivosti za obe grupe proizvoda od mesa.

6.3. Senzorna ocena boje eksperimentalnih proizvoda

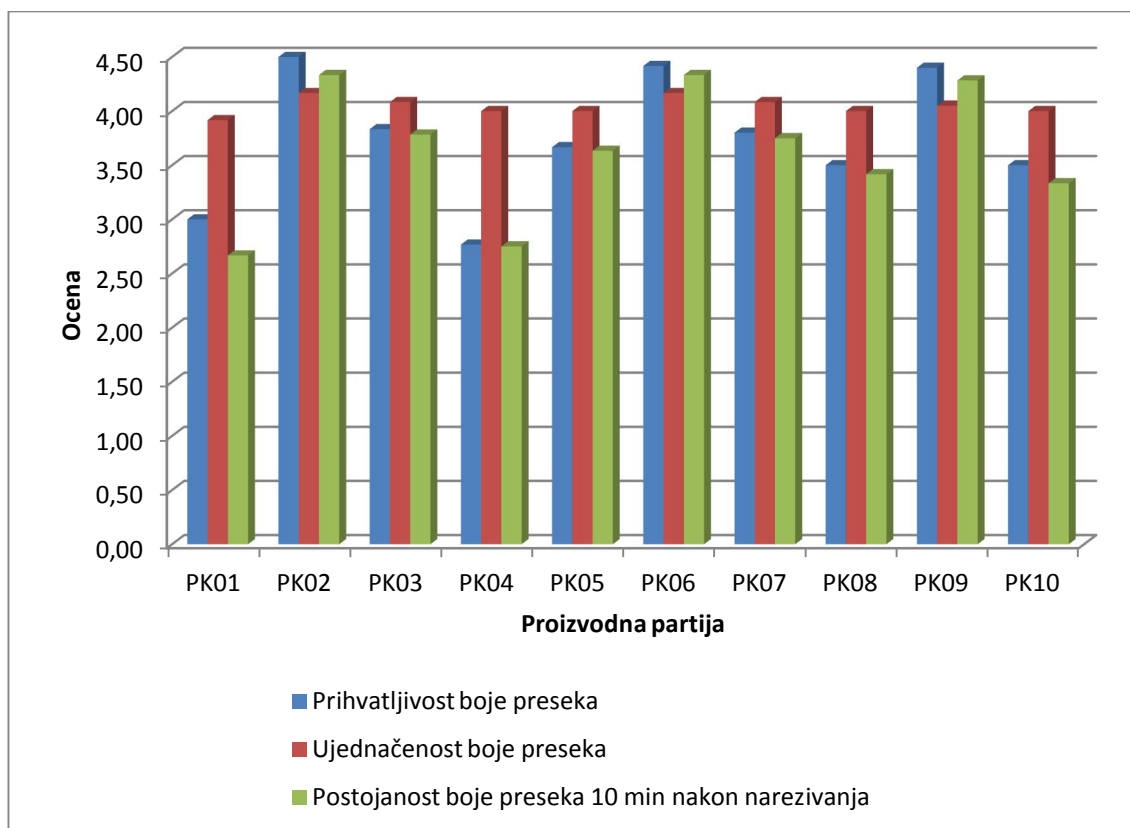
Sledeća grupa ispitivanja u okviru provere kvaliteta eksperimentalnih proizvoda od mesa i njihove prihvatljivosti za primenu u razvoju i validaciji instrumentalnih metoda za određivanje boja su bila senzorna ispitivanja.

6.3.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

U okviru senzornih ispitivanja određivani su prihvatljivost boje preseka, ujednačenost boje preseka i postojanost boje 10 minuta po narezivanju. Grafički prikaz ocena senzornih svojstava eksperimentalne „pariske kobasice“ je dat na slici 8.

Senzorne ocene boje eksperimentalne „pariske kobasice“ statistički su ispitivane metodom analize varijanse i *Taki-Kramer*-testom poređenja srednjih vrednosti. Ocene ujednačenosti boje preseka su bile bliske za sve ispitivane uzorke i statističkim testiranjem nije utvrđena značajnost razlika srednjih vrednosti ovih ocena. Sve ocene su bile ujednačene i nešto veće od 4,00, osim za kontrolni proizvod bez dodate boje čija je

ocena ujednačenosti boje preseka iznosila 3,92. Dodavanjem boje postiže se ujednačeniji izgled preseka, ali taj uticaj nije jedini faktor od posebnog značaja. Na ujednačenost boje, takođe, utiču stepen usitnjavanja sirovina pri izradi barenih kobasica i visok stepen homogenosti nadeva.



Slika 8 – Senzorne ocene ispitivanih senzornih svojstava eksperimentalne „pariske kobasice“

Kada se posmatraju rezultati statističke analize ocena prihvatljivosti boje preseka i postojanosti boje 10 minuta po narezivanju, dobijaju se slični rezultati. Proizvodne partije „pariske kobasice“ 2, 6 i 9 su najprihvatljivije u pogledu boje preseka i postojanosti boje. Njihove ocene su između 4,00 i 4,50. Najprihvatljiviju boju preseka je imala „pariska kobasica“ sa najnižim sadržajem Košenile (3,4 mg/kg, proizvodna partija 2), a zatim „pariske kobasice“ sa sadržajem Ponsa 4R i Alura crvene AC u količini od 15 mg/kg (proizvodne partije 6 i 9).

Senzorne ocene „pariske kobasice“ proizvodnih partija 3, 5, 7, 8 i 10 su bile između 3,50 i 4,00 za prihvatljivost boje preseka, a za postojanost boje u proseku oko 3,50. Proizvodne partije eksperimentalne „pariske kobasice“ 1 i 4 su dobile ocene niže od 3,00 u ovim kategorijama. Boja preseka proizvodne partije 1 je previše svetla, a partije 4 previše intenzivna.

Rezultati *t*-testa ocena prihvatljivosti boje preseka odmah po narezivanju i 10 nakon minuta za svaku proizvodnu partiju eksperimentalne „pariske kobasice“ su pokazali da nema statistički značajnih razlika, odnosno da je boja preseka proizvoda postojana. Najveća razlika senzornih ocena boje preseka neposredno po narezivanju i 10 minuta nakon narezivanja je zapažena kod proizvodne partije 1, odnosno kontrolnog proizvoda bez dodate boje, što ukazuje da dodatak prehrambenih boja pozitivno utiče na postojanost boje preseka.

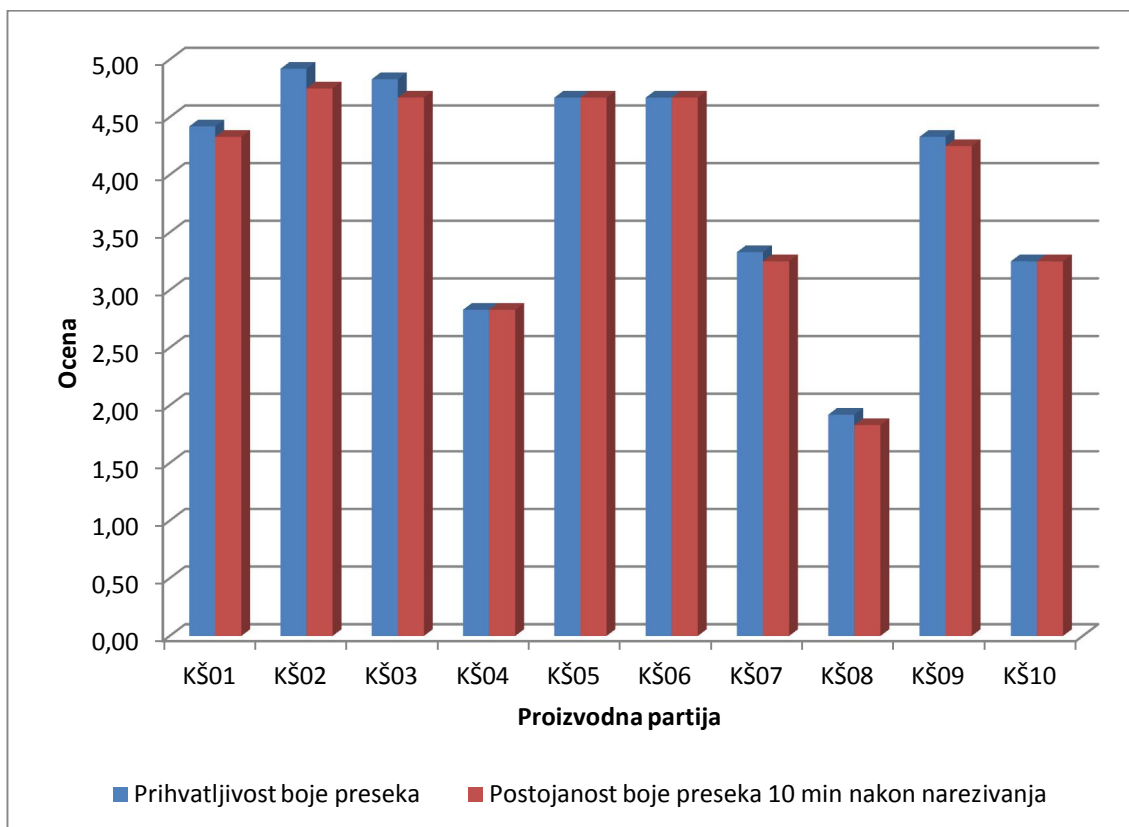
6.3.2. Eksperimentalna konzerva „kuvana šunka“

Kod eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“ ocenjivana je takođe prihvatljivost boje preseka i postojanost boje 10 minuta nakon narezivanja. Ujednačenost boje preseka „kuvane šunke“ nije ocenjivana zbog nehomogenosti boje.

Senzorne ocene boje eksperimentalne „kuvane šunke“ prikazane su grafički na slici 9.

Najviše ocene ispitivanih senzornih svojstava su imale proizvodne partije „kuvane šunke“ 2 i 3, sa 2 i 5 mg/kg Košenile i „kuvane šunke“ sa istim količinom Ponsa 4R (proizvodne partije 5 i 6), preko 4,50. Prihvatljivost boje „kuvane šunke“ bez dodate boje i sa dodatkom Alura crvenom AC u količini od 5 mg/kg takođe je visoko ocenjena, preko 4,00. Kod ovih proizvoda, mišići su imali karakterističnu boju mesa, dok su žele i masni delovi preseka očuvali prirodnu, karakterističnu žućkastu boju. Proizvodne partije „kuvane šunke“ sa najvećim količinama sve tri boje (15 mg/kg) su niže ocenjene zbog previše intenzivne boje mesnatih delova i ružičaste, nekarakteristične boje želea i masnih delova preseka. Najnižu ocenu ispitivanih senzornih svojstava, ispod 2, je dobila proizvodne partije „kuvane šunke“ 8, sa sadržajem Alura crvene AC od 2 mg/kg. Boja

ovog proizvoda je bila žuta, a ne crvena, jer se boja dodata u niskoj koncentraciji verovatno razgradila u toku termičke obrade.



Slika 9 – Senzorne ocene ispitivanih senzornih osobina konzerve „kuvana šunka“

Poređenjem prihvatljivosti boje preseka odmah i 10 minuta po narezivanju *t*-testom nije utvrđena statistička značajnost rezultata promene boje preseka u toku stajanja. Promene boje „kuvane šunke“ su bile manje izražene nego kod „pariske kobasice“. Boja preseka „kuvane šunke“ sa dodatim bojom Ponso 4R je bila izuzetno postojana.

Senzorna ocenjivanja ispitivanih svojstava proizvoda pokazuju da postoji značajna razlika prihvatljivosti boje proizvoda u zavisnosti od vrste i količine dodate boje. Kod obe vrste eksperimentalnih proizvoda od mesa dodavanjem boje dobijani su proizvodi sa boljim karakteristikama boje preseka nego proizvodi bez dodate boje.

Na osnovu rezultata hemijskih, fizičko-hemijskih i senzornih ispitivanja može se zaključiti:

- da su eksperimentalni proizvodi od mesa ujednačenog hemijskog sastava;
- da ispunjavaju zahteve kvaliteta za odgovarajuće proizvode od mesa;
- da su adekvatni predstavnici svoje klase proizvoda od mesa, odnosno da eksperimentalno izrađeni proizvodi po svojim karakteristikama odgovaraju proizvodima koji se nalaze u prodaji;
- da prihvatljivost karakteristične boje preseka eksperimentalnih proizvoda zavisi od vrste i količine dodate boje i
- da se dodavanjem boje mogu dobiti eksperimentalni proizvodi koji imaju bolje karakteristike od proizvoda bez dodate boje koji su izrađeni pod istim uslovima.

6.4. Kolorimetrijsko ispitivanje (CIE L*a*b*) eksperimentalnih proizvoda

CIE L*a*b* kolorimetrija se koristi za izračunavanje koordinata L*, a* i b* instrumentalnim merenjem karakteristika boje površine predmeta uključujući međusobni odnos svetlosti, boje i tona.

Kolorimetrijsko ispitivanje boje preseka proizvoda od mesa po CIE L*a*b* sistemu primenjeno je da bi se omogućilo brzo instrumentalno određivanje karakteristika boje proizvoda sa dodatim bojama kao i bez boja u proizvodu. Za razliku od senzornih ispitivanja, kolorimetrijska merenja ne zavise od subjektivnih razlika ispitivača, te podaci dobijeni kolorimetrijskim određivanima mogu da se ocene kao pouzdaniji. Drugo, kolorimetrijskim ispitivanjima se dobijaju podaci o promenama boje preseka u zavisnosti od vrste i količine dodate boje, a ne o prihvatljivosti boje. Ipak, poređenjem senzornih ocena sa kolorimetriskim karakteristikama boje preseka proizvoda mogu se dobiti značajne informacije u kojim intervalima vrednosti L*, a* i b* parametara je boja proizvoda prihvatljiva, kao i da se pouzdanije odredi da li dolazi do značajnih promena boje preseka stajanjem. Iz navedenog se može zaključiti da senzorna ispitivanja i kolorimetrijska određivanja boje preseka predstavljaju komplementarna ispitivanja koja daju potpuniju sliku o boji proizvoda i njegovoj prihvatljivosti potrošaču.

Sama kolorimetrija ne može dati podatke o vrsti dodate boje, jer na dobijene vrednosti utiču sve obojene materije prisutne na površini preseka proizvoda. Pouzdanost merenja zavisi od homogenosti boje preseka proizvoda, tako da će podaci o merenju boje kod proizvoda koji su fino usitnjeni i homogeni, kao u slučaju fino usitnjenih barenih kobasica, biti pouzdaniji i tačniji, nego kod proizvoda koji su nehomogenog izgleda preseka.

Jedan od ciljeva ove disertacije je pokušaj da se kolorimetrijska merenja, u kombinaciji sa rezultatima tečnohromatografskog određivanja, iskoriste za brza, preliminarna određivanja prisustva dodatih boja u proizvodima od mesa, direktno, bez dodatne pripreme uzoraka za ispitivanje.

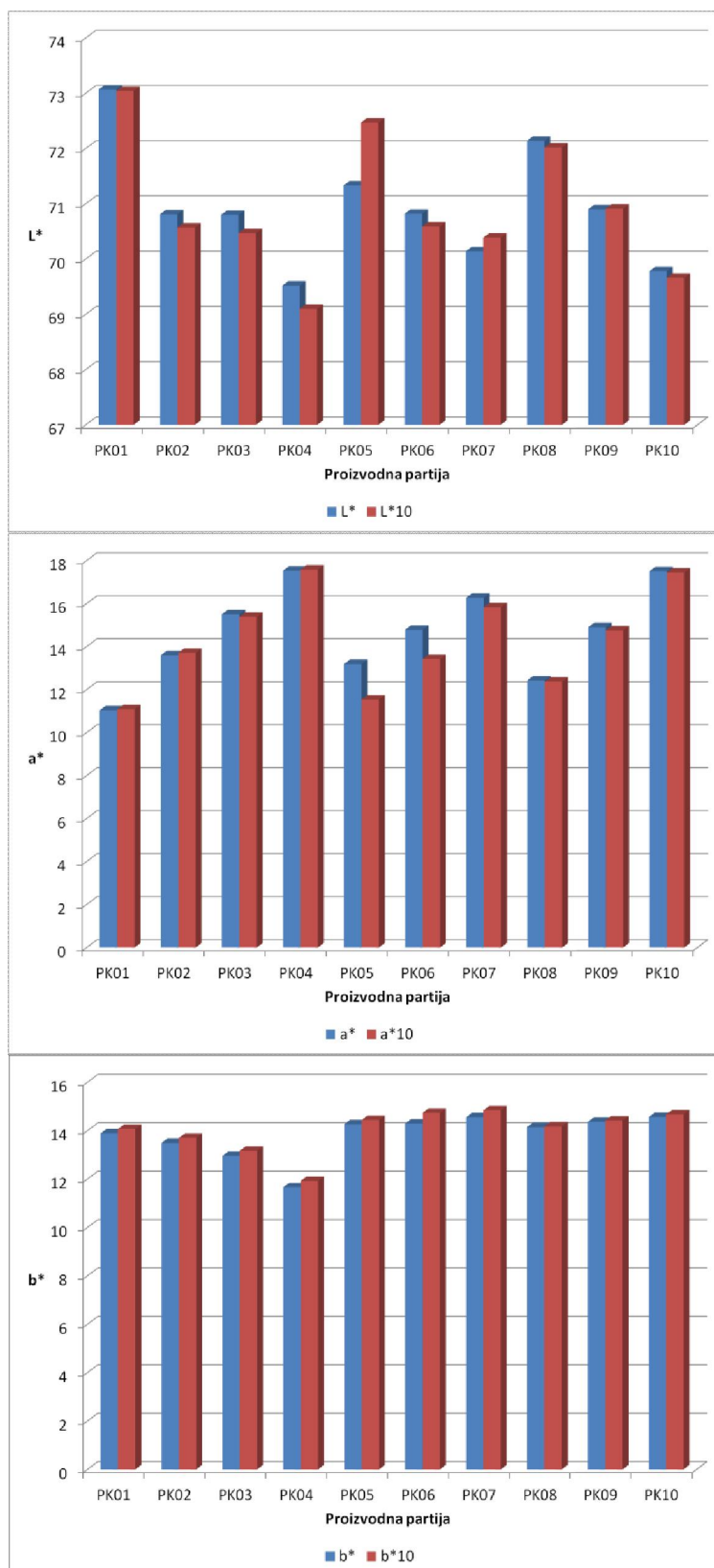
6.4.1. Eksperimentalna „pariska kobasica“

Fino usitnjene barene kobasice su, zbog homogenog izgleda preseka, pogodne za kolorimetrijska ispitivanja boje preseka. Kolorimetrijsko merenje boje preseka fino usitnjenih barenih kobasica ne daje samo informacije o kvalitetu proizvoda već i o kvalitetu procesa proizvodnje. Proverom ujednačenosti boje na više preseka istog proizvoda može se dobiti uvid u homogenost mešanja sirovina u toku procesa izrade barenih kobasica i na taj način vršiti proveru tehnološkog procesa proizvodnje ovih proizvoda.

Kolorimetrijskim merenjem boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“ dobijeni su podaci o svetloći boje preseka, L^* , udelu crvene boje, a^* i udelu žute boje, b^* . Isti parametri su određivani, na istim presecima, posle 10 minuta radi poređenja sa rezultatima senzornih ocenjivanja.

Rezultati kolorimetrijskih merenja preseka eksperimentalne „pariske kobasice“ su grafički prikazani na slici 10.

Eksperimentalna „pariska kobasica“ sa dodatim bojama ima niže vrednosti za svetloću u odnosu na proizvod bez dodate boje (kontrolni proizvod). Takođe, primećuje se da sa porastom količine dodate boje opada vrednost L^* kod sve tri serije eksperimentalne „pariske kobasice“.



Slika 10 – Kolorimetrijska merenja boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“

Kod proizvoda sa dodatim bojama Ponso 4R i Alura crvena AC smanjivanje vrednosti L^* je kontinualno i postoji linearna zavisnost, dok kod „pariske kobasice“ sa Košenilom vrednosti L^* opadaju nelinearno sa povećanjem količine boje u proizvodima. Stajanjem svetloća proizvoda sa dodatom Košenilom opada, kod proizvoda sa dodatom bojom Alura crvena AC slabo opada, a kod „pariske kobasice“ sa bojom Ponso 4R se ne može izvesti pouzdan zaključak.

Kada se posmatraju rezultati kolorimetrijskog određivanja udela crvene boje u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“, na prvi pogled se primećuje linearna zavisnost promene vrednosti a^* sa povećanjem količine sve tri boje. Najveći porast vrednosti a^* sa povećanjem količine dodate boje je kod „pariske kobasice“ sa dodatom Košenilom (nagib prave je 0,50), zatim kod proizvoda sa dodatom Alura crvenom AC (nagib 0,26), a najmanji je kod proizvoda sa dodatom bojom Ponso 4R (nagib 0,20). Uzevši u obzir da su količine Košenile koje su korišćene pri izradi „pariske kobasice“ bile niže od količina druge dve boje (tabela 3), može se zaključiti da je ova boja intenzivnije boji proizvode od mesa. Poredeći rezultate merenja vrednosti a^* odmah po narezivanju i posle 10 minuta može se zaključiti da kod eksperimentalne „pariske kobasice“ sa dodatom Košenilom nema promene udela crvene boje, kod „pariske kobasice“ sa dodatom bojom Ponso 4R vrednost a^* opada stajanjem, što je izraženije pri manjim količinama boje, a kod kobasice sa dodatom bojom Alura crvena AC vrednost a^* opada neznatno.

Kolorimetrijsko merenje udela žute boje je pokazalo da eksperimentalna „pariska kobasica“ sa dodatim veštačkim bojama, Ponso 4R i Alura crvena AC, imaju više vrednosti b^* u odnosu na kontrolni proizvod. Eksperimentalna „pariska kobasica“ sa dodatom bojom Košenila ima nižu vrednost b^* u odnosu na proizvode sa sintetičkim bojama i kontrolni proizvod. Primećuje se da vrednost b^* opada sa povećanjem količine boje kod proizvodnih partija „pariske kobasice“ sa dodatom Košenilom. Kod eksperimentalne „pariske kobasice“ sa dodatim sintetičkim bojama sa porastom količine dodate boje vrednost b^* blago raste. U toku stajanja vrednost b^* boje preseka svih eksperimentalnih kobasica se povećavala.

Rezultati *t*-testa poređenja kolorimetrijskih parametara odmah po narezivanju i 10 minuta nakon narezivanja su potvrdili zaključak senzorne analize da nema značajnih promena u boji preseka proizvoda stajanjem.

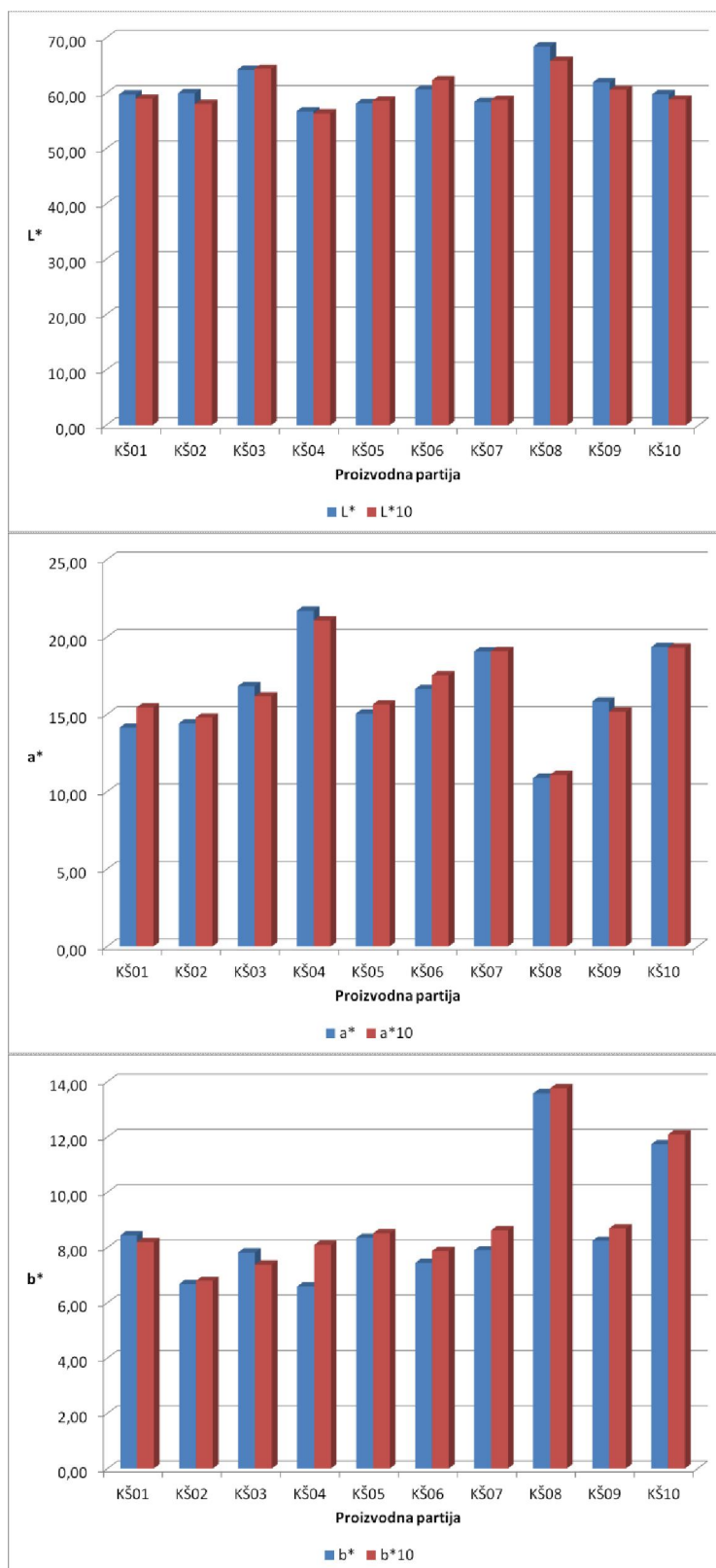
6.4.2. Eksperimentalna konzerva „kuvana šunka“

Uporedivost rezultata kolorimetrijskih ispitivanja boje preseka eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“ usled nehomogenosti izgleda preseka je daleko manje pouzdana nego kod „pariske kobasice“. Na preseku proizvoda su jasno uočljivi komadi mesa, masnog i vezivnog tkiva, žele itd. koji su različite boje i veličine polja koja zauzimaju na površini preseka. Komadi mesa koji se koriste za izradu kuvane šunke potiču od različitih mišića svinjskog buta, koji imaju različitu boju, što doprinosi neujednačenosti rezultata kolorimetrijskog ispitivanja. Kada se tome doda još i prisutno masno i vezivno tkivo, koji su beličaste boje, žele koji ima žućkastu boju i providan je, kao i druge komponente koje su vidljive na površini preseka, a čije boje se kreću od žućkaste do ružičaste, postaje jasnije zašto se rezultati kolorimetrijskog ispitivanja boje preseka konzervi od mesa u komadima moraju uzeti sa rezervom i pažljivo tumačiti.

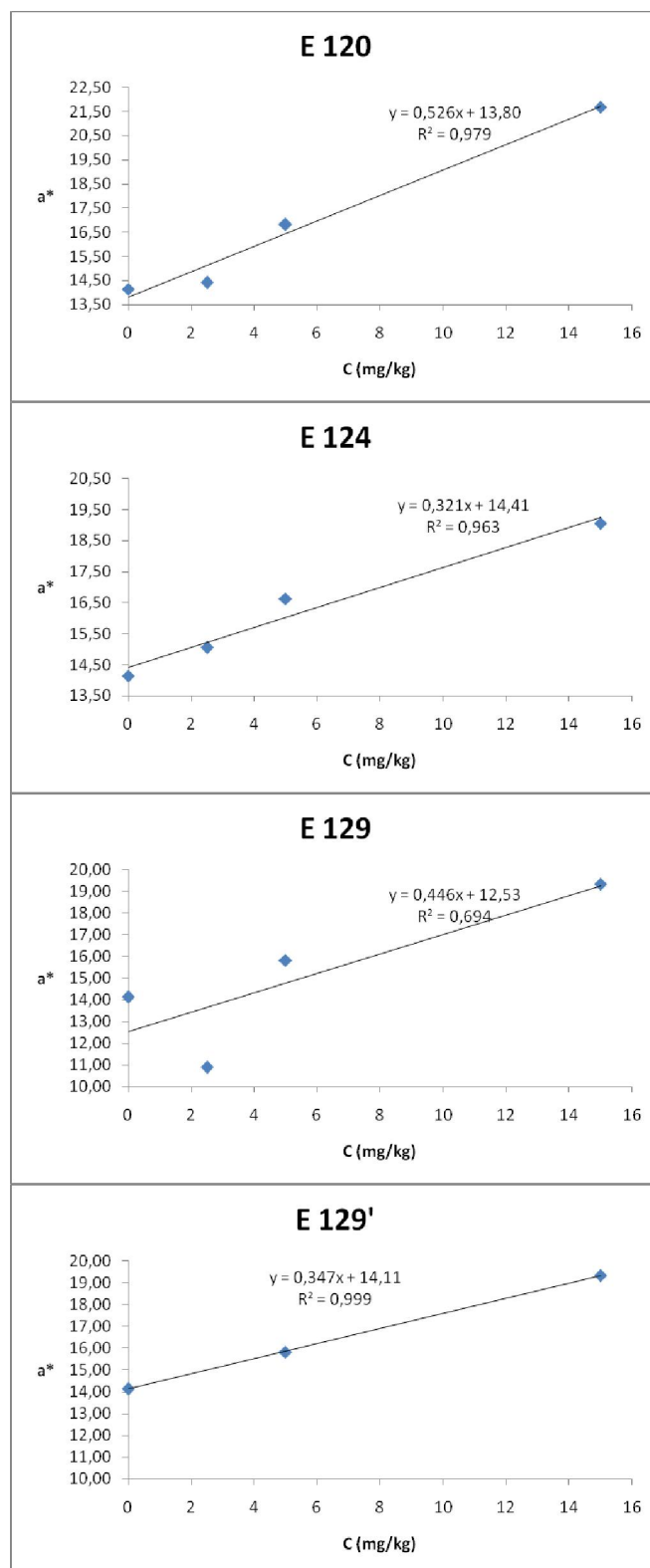
Rezultati kolorimetrijskih merenja preseka eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“ su grafički prikazani na slici 11.

Vrednosti L^* eksperimentane „kuvane šunke“ ne pokazuju značajnija odstupanja unutar cele serije proizvoda i iznose u proseku oko 60, osim proizvodne partije „kuvane šunke“ 8 kod koje je vrednost L^* veća. Vrednosti standardnih devijacija određivanja svetloće u celoj seriji proizvoda se kreću od 1,1 do 7,48 jedinica i te vrednosti su veće u odnosu na standardne devijacije određivanja vrednosti L^* kod „pariske kobasice“ koje su se kretale, u proseku, od 0,20 % do 0,50 %.

Rezultati kolorimetrijskog merenja udela crvene boje i kod „kuvane šunke“ pokazuju porast vrednosti a^* u zavisnosti od povećavanja količine dodate boje. Na slici 12 grafički su prikazane zavisnosti rezultati merenja vrednosti a^* od količine dodatih boja u eksperimentalnoj „kuvanoj šunki“.



Slika 11 – Kolorimetrijska merenja boje preseka eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“



Slika 12 – Zavisnost vrednosti a* od količine dodatih boja kod eksperimentalne konzerve „kuvana šunka“

Kao i kod eksperimentalne „pariske kobasice“, tako se i kod „kuvane šunke“ primećuje da proizvodi sa dodatom bojom Košenila pokazuju najveći porast vrednosti a^* za isti interval količine dodate boje (nagib 0,53), zatim proizvodi sa dodatom bojom Alura crvena AC (0,45) i proizvodi sa dodatom bojom Ponso 4R (0,32). Dobijeni koeficijenti determinacije (R^2) od 0,98 i 0,96 kod eksperimentalne „kuvane šunke“ sa dodatim bojama Košenila i Ponso 4R ukazuju na postojanje linearne zavisnosti promene vrednosti a^* pri porastu količine dodatih boja. Kod „kuvane šunke“ sa dodatom bojom Alura crvena AC koeficijent determinacije je iznosio 0,69 i, na osnovu ovog podatka, ne bi moglo da se tvrdi da postoji linearna zavisnost vrednosti a^* od količine ove dodate boje. Međutim, kao što je prikazano na slici 12, kada se ukloni podatak za proizvodnu partiju „kuvane šunke“ 8, koja očigledno grubo odstupa od serije (tzv. „outlier“) dobija se sasvim druga situacija (E 129' na slici 12). Koeficijent determinacije je sada skoro 1 što je idealna linearna zavisnost. Na osnovu analize rezultata kolorimetrijskog merenja vrednosti a^* može se zaključiti da postoji linearna zavisnost udela crvene boje od vrste i količine dodate boje kod eksperimentalnih konzervi od mesa u komadima.

Vrednosti udela žute boje, b^* , su bile nešto niže kod eksperimentalne „kuvane šunke“ sa dodatim bojama Košenila i Ponso 4R, nego kod kontrolnog proizvoda bez dodate boje. Na osnovu izmerenih vrednosti nije moguće utvrditi da li postoji zavisnost kod vrednosti b^* od promene količine dodate boje u eksperimentalnim proizvodima. Vrednost b^* kod „kuvane šune“ sa dodatom bojom Alura crvena AC je, u proseku veća nego kod kontrolnog proizvoda. Kao i kod „kuvane šunke“ sa Košenilom i Pansom 4R, tako ni kod proizvoda sa Alura crvenom AC nije bilo moguće utvrditi postojanje zavisnosti vrednosti b^* od količine dodate boje.

Kao i kod eksperimentalne „pariske kobasice“, tako i kod „kuvane šunke“ rezultati t -testa poređenja kolorimetrijskih parametara odmah po narezivanju i 10 minuta nakon narezivanja potvrđuju zaključak senzorne analize da nema značajnih promena u boji preseka proizvoda stajanjem.

6.5. Tečno-hromatografsko određivanje boja (HPLC analiza)

Razvoj metode za tečnohromatografsko određivanje boja u proizvodima od mesa je izveden u nekoliko faza koje su navedene u prethodnim poglavljima. Posle određivanja uslova za hromatografsko razdvajanje boja i optimizacije ekstrakcije boja iz proizvoda od mesa, razvijena metoda je proverena na eksperimentalnim proizvodima od mesa. Dobijeni rezultati razvoja i provere tečnohromatografske metode će biti predmet diskusije u narednim poglavljima.

6.5.1. Određivanje uslova za tečnu hromatografiju

U preliminarnim ispitivanjima je utvrđeno da se hromatografisanjem pri stalnom protoku i sastavu mobilne faze (izokratski) ne dobija dobro razdvajanje ispitivanih boja i da se Košenila sporo eluiru sa kolone, tj. hromatografski pik ove boje je „razvučen“. Pošto je planirano da metoda, između ostalih postavljenih uslova, bude razvijena za rutinsku upotrebu u kontroli prisustva boja u proizvodima od mesa, vreme izvođenja tečnohromatografskog određivanja ne bi trebalo da bude duže od 15 do 20 minuta. Izokratskim razdvajanjem, odnosno hromatografisanjem mobilnom fazom stalnog sastava se nije mogao ispuniti ovaj uslov. Pregledom literature je utvrđeno da je za rešavanje ovih problema i dobro razdvajanje boja najbolje koristiti gradijentno razdvajanje, kada se sastav mobilne faze menja u toku hromatografisanja, na reversno-faznoj koloni sa oktadecil-modifikovanim silikagelom, C18 (Carvalho i Collins, 1997, Miniotti i sar., 2007, Yoshioka i Ichihashi, 2008).

U okviru pripremnih istraživanja ispitivani su različiti sastavi mobilne faze, od smeše čistih rastvarača sa vodom kao što su, najčešće korišćeni, acetonitril i metanol, do upotrebe amonijum acetatnog pufera. Zbog moguće kristalizacije soli upotrebljenih za pravljenje pufera, izbegavani su fosfatni i drugi puferi koji sa, eventualno prisutnim jonima metala, mogu da grade precipitate. Kristalizacija i precipitacija su najčešći uzroci kvara tečnohromatografskih sistema. Takođe, izbegavani su rastvori isparljivih kiselina kao što su mravlja i hlorovodonična, koji su navedeni u literaturi da su korišćeni u sastavu mobilne faze za hromatografsko određivanje boja (Carvalho i

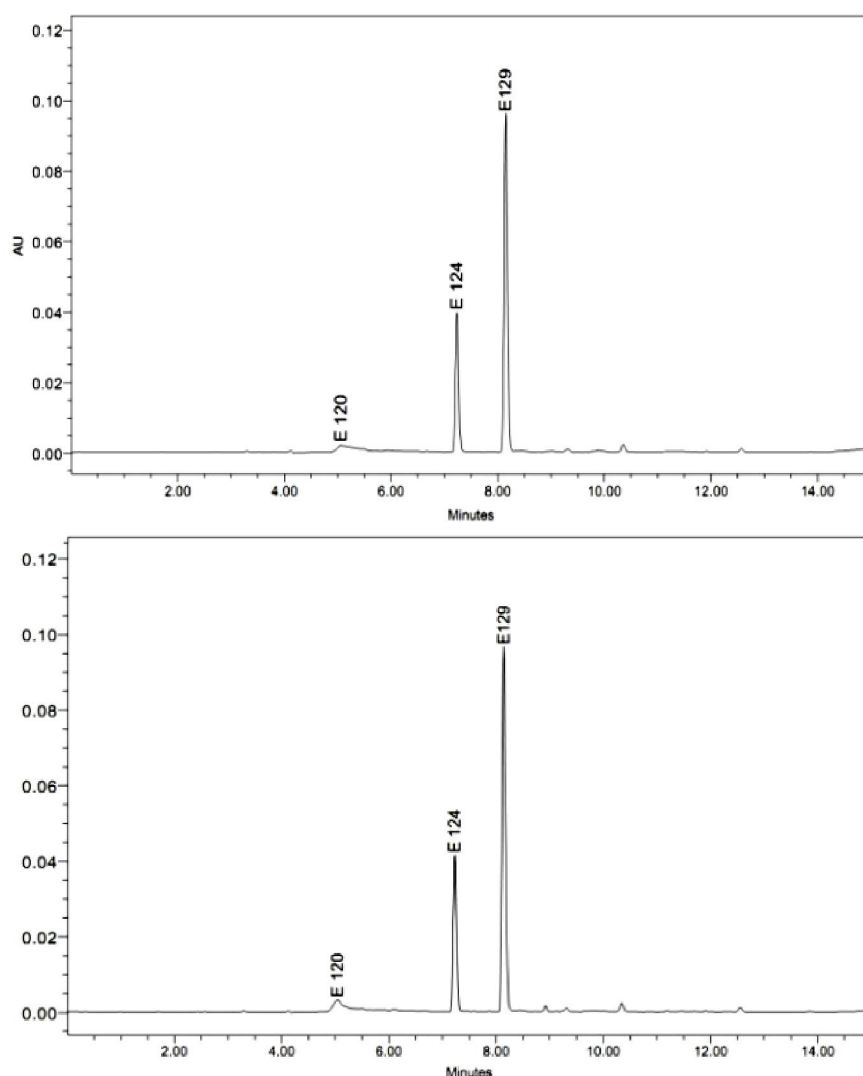
Collins, 1997, Chen i sar., 1998). Za sastav mobilne faze izabrani su vodeni rastvor amonijum acetatnog pufera koncentracije 50 mM (mmol/dm^3) i acetonitril. Amonijum acetat je pogodan jer je dobro rastvoran u rastvaračima korišćenim u toku razvoja hromatografske metode, zatim jer acetati teško daju precipitate sa metalnim jonima i koncentracija je dovoljno niska da se izbegne kristalizacija u sistemu.

Izvršena je optimizacija detekcije. Detektor sa fotodiodnim slojem može da prati istovremeno više talasnih dužina svetlosti i da snima apsorpcione spektre u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti (UV/VIS spektre) sastava mobilne faze koja protiče kroz ćeliju detektora u širokom opsegu talasnih dužina. Moguće je izdvojiti delove spektra i istovremeno odrediti intenzitete apsorpcije propuštene svetlosti od strane ispitivanih supstanci sa različitim maksimumima apsorpcije. Takođe, moguće je izdvajanje UV/VIS spektra supstance iz hromatograma na retencionom vremenu vrha analitičkog signala ispitivane supstance. Na ovaj način su, u toku razvoja tačnohromatografske metode za određivanje Košenile, Ponsa 4R i Alura crvene AC, izdvojeni njihovi UV/VIS spektri koji su, u toku hromatografskih ispitivanja eksperimentalnih i proizvoda od mesa iz prodaje, korišćeni kao potvrda prisustva ispitivanih boja (Carvalho i Collins, 1997, Kirschbaum i sar., 2003, Miniotti i sar., 2007., Luo i sar, 2012).

Pošto su UV/VIS spektri karakteristični za svako jedinjenje, moguća je vrlo pouzdana potvrda (konfirmacija) prisustva ispitivanih supstanci, kao i eliminacija lažno pozitivnih rezultata. To je još jedna od prednosti ove hromatografske metode za određivanje boja u proizvodima od mesa. Za razliku od masenog detektora koji takođe ima mogućnost konfirmacije i koristi se u tačnoj hromatografiji, detektor sa fotodiodnim slojem je daleko jeftiniji, jednostavniji za rukovanje i ne zahteva posebne dodatke i prostor.

Posle niza ispitivanja, postavljen je gradijent rastvarača za hromatografisanje ispitivanih boja (tabela 23). Na početku kroz hromatografski sistem prolazi samo 50 mM amonijum acetatni pufer. Odmah po injektovanju, do 12. minuta, postepeno raste udeo acetonitrila do udela od 60 %. Šest sekundi kasnije (12,1 minut po injektovanju) udeo acetonitrila u mobilnoj fazi naglo pada na 0 %, odnosno kroz sistem protiče samo amonijum acetatni pufer.

Ispitivan je uticaj pH pufera na razdvajanje i izgled analitičkih signala boja u hromatogramu. Za ova ispitivanja su korišćeni amonijum acetatni puferi istih koncentracija, 50 mM, dve pH vrednosti, 4 i 7. Za ova ispitivanja su korišćeni standardni rastvori smeše boja Košenile, Ponsa 4R i Alura crvene AC koncentracije 10 µg/ml. Dobijeni hromatogrami su prikazani na slici 13.

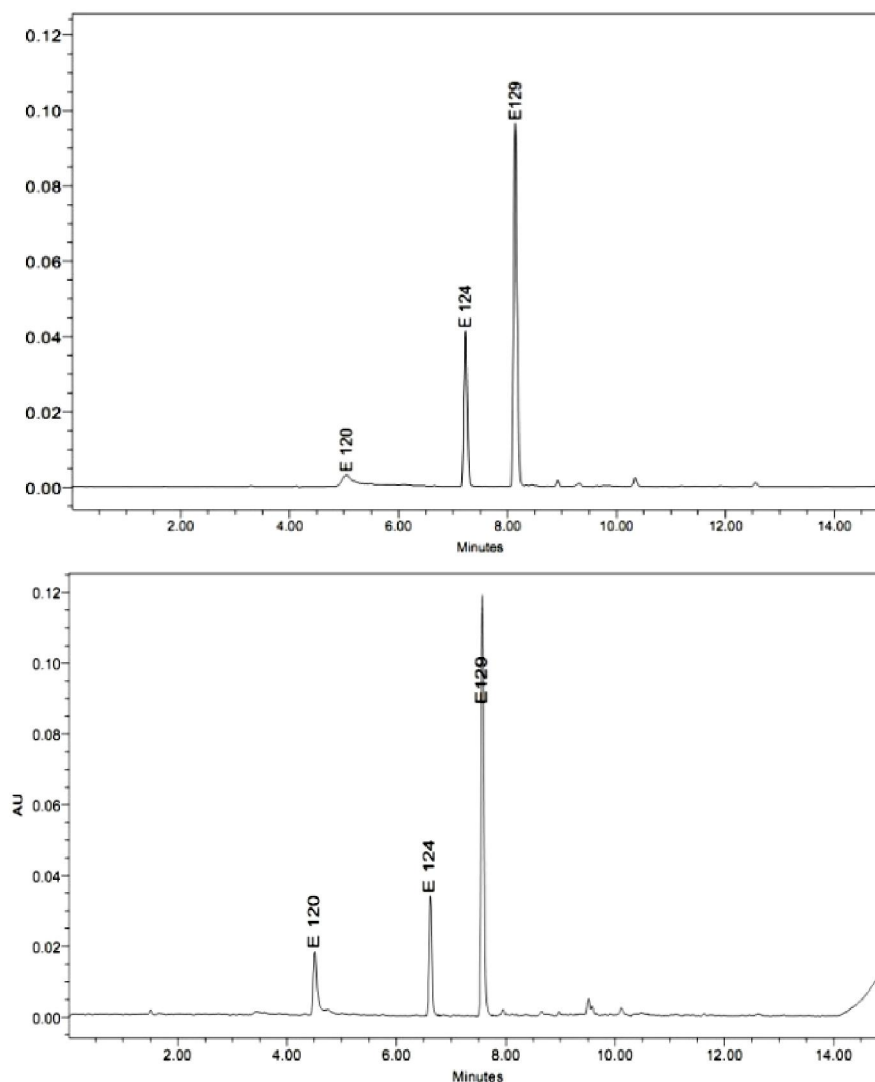


Slika 13 – Hromatogrami gradijentnog teĥnohromatografskog ispitivanja boja amonijum acetatnim puferom pH = 4 (levo) i pH = 7 (desno)

Promena pH vrednosti pufera nije uticala na retenciona vremena eluiranja boja sa kolone (C18) ali je uticala na izgled pika Košenile. U prvom sluĥaju pik ove boje je razvuĥen sa nejasno definisanim maksimumom. Razvlaĥenje pika (tzv. „tailing“) je

uočljivo i pri pH 7, ali je pik bolje definisan i maksimum je jasno izražen. Za dalji rad je korišćen 50 mM vodeni rastvor amonijum acetatnog pufera pH = 7.

Kao što je ranije navedeno ispitivano je hromatografsko određivanje boja na dve različite reversno-fazne kolone. U tu svrhu su korišćene kolona sa uobičajenom C18 čvrstom stacionarnom fazom i C18 kolona sa česticama sa čvrstim jezgrom. Dobijeni hromatogrami su prikazani na slici 14.



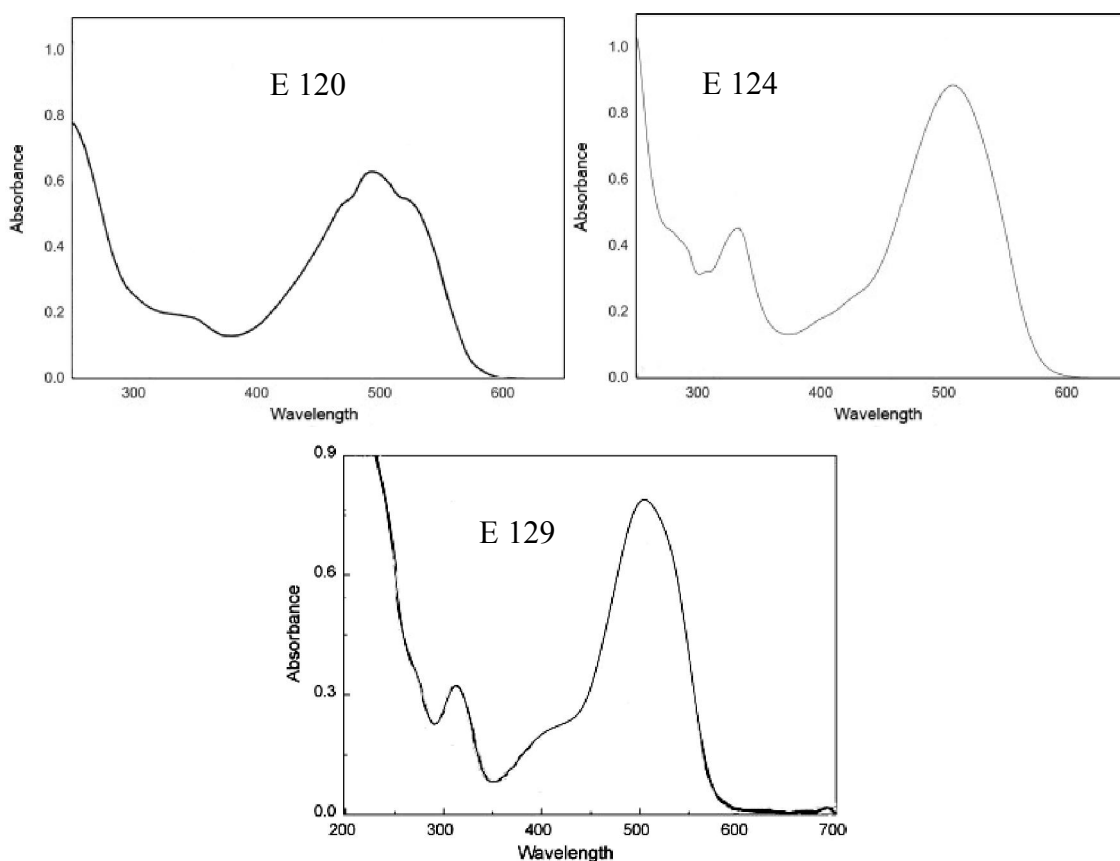
Slika 14 – Hromatogrami ispitivanja određivanja boja u zavisnosti od upotrebene kolone

Na prvi pogled je primetno da je pik Košenile mnogo bolje definisan, maksimum je jasno izražen, a razvlačenje pika smanjeno. Pikovi Ponsa 4R i Alura crvene AC su,

takođe, uži, a zadržavanje boja na koloni (retenciono vreme) je smanjeno. Sve tri boje se eluiraju za manje od 8 minuta.

Najveće poboljšanje upotrebom kolone sa česticama sa čvrstim jezgrom je u osetljivosti određivanja Košenile. U pregledanoj literaturi nije navedena upotreba hromatografskih kolona sa česticama sa čvrstim jezgrom za hromatografsko određivanje boja u hrani.

Apsorpcioni spektri ispitivanih boja zavise od sastava rastvora u kojem se snimaju. Mobilna faza ima različit sastav u trenutku eluiranja svake od ispitivanih boja. Pošto su, u međuvremenu izabrani sastav mobilne faze i način eluiranja boja sa kolone, kao i vrsta kolone na kojoj će se vršiti dalja ispitivanja, preostalo je da se izdvoje UV/VIS spektri boja na maksimumu hromatografskih signala koji će služiti za pouzdanu potvrdu prisustva boja u ispitivanim proizvodima od mesa. Na slici 15 su prikazani apsorpcioni spektri ispitivanih boja određeni u toku hromatografskog razdvajanja.



Slika 15 – Apsorpcioni spektri ispitivanih boja određeni na maksimumu hromatografskih signala

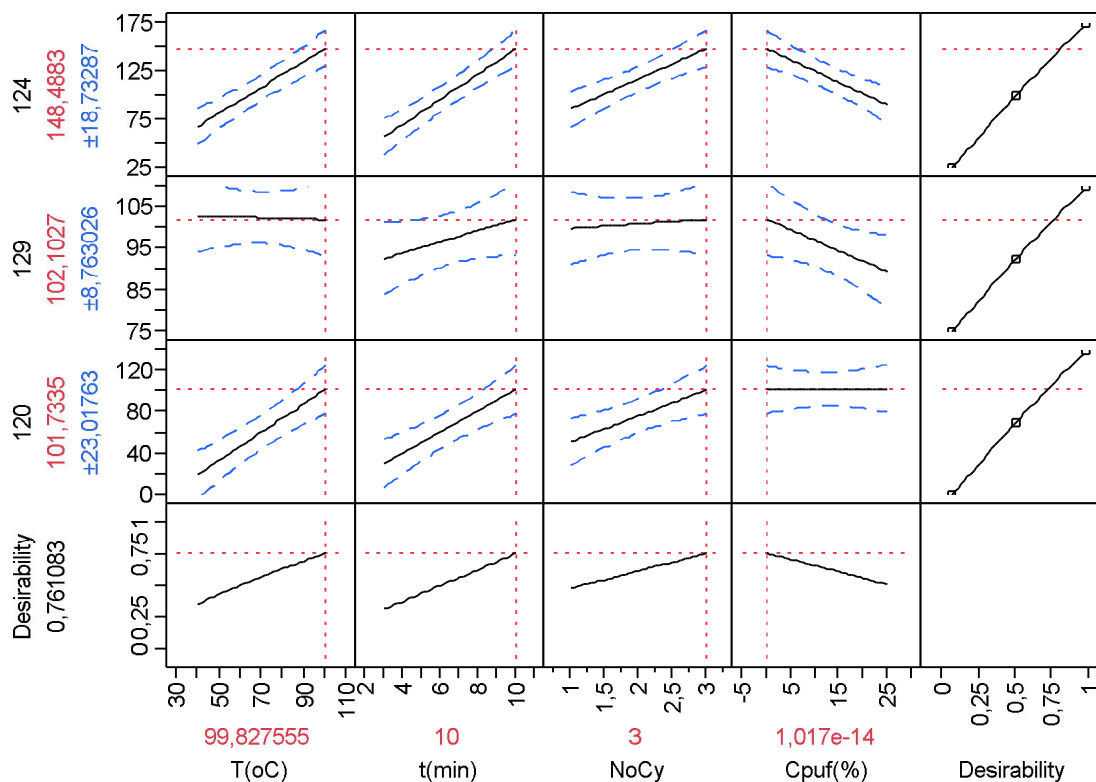
6.5.2. Ubrzana ekstrakcija boja na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku

Za izolovanje ispitivanih boja iz proizvoda od mesa je primenjena ubrzana ekstrakcija rastvaračima na povišenoj temperaturi i pritisku (Accelerated Solvent Extraction, ASE). Prednosti ubrzane ekstrakcije rastvaračima su već izložene u prethodnim poglavljima, ali treba naglasiti da je ovaj način izolovanja boja automatizovan, da pojednostavljuje manipulaciju uzorkom i skraćuje proces pripreme (Dean i Gouhua, 2000).

U početnim ispitivanjima postupka ekstrakcije izabrani su faktori koji mogu uticati na ubranu ekstrakciju rastvaračima. Temperatura na kojoj se vrši ekstrakcija boja iz proizvoda od mesa, dužina trajanja ekstrakcije (ekstrakcioni ciklus), broj ponovljenih ekstrakcija (ciklusa) i sastav rastvarača kojim se vrši ekstrakcija su smatrani najvažnijim faktorima koji mogu povećati efikasnost ekstrakcije, odnosno povećati količine izolovanih boja iz proizvoda od mesa (González i sar., 2002, Luo i sar., 2012). Pritisak na kojem se vrši proces ekstrahovanja je bio konstantan (1500 psi, 10,3 MPa) jer uređaj koji je korišćen za razvoj i optimizaciju izolovanja nema mogućnost podešavanja pritiska.

Za početna ispitivanja je izabran potpuni faktorski eksperimentalni dizajn za četiri faktora na dva nivoa sa vrednostima ispitivanih faktora koji je prikazan u tabelama 7 i 24. Svaki eksperiment naveden u tabeli je izveden u dva ponavljanja. Rezultati ovako osmišljenih eksperimenata su analizirani i grafički prikazani na slici 16.

Sličan pristup je korišćen pri izolovanju pigmenta iz Košenila insekata, *Dactylopius coccus* Costa, ubranom ekstrakcijom na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku (González i sar., 2002). Određivane su optimalne vrednosti relevantnih faktora koji utiču na ubranu ekstrakciju pigmenta. Ispitivani su temperatura ekstrakcije, vreme ekstrakcije, broj ponovljenih ekstrakcija i koncentracija metanola u ekstrakcionoj smeši. Za ispitivanje je korišćen faktorski Draper-Lin centralni kompozitni dizajn eksperimenta. Na osnovu podataka dobijenih analizom primenjenog eksperimentalnog dizajna utvrđeno je da su najznačajniji uticaj na ekstrakciju pigmenta imali vreme ekstrakcionog ciklusa i broj ponavljanja ekstrakcionih ciklusa (ekstrakcija).



Slika 16 – Rezultati analize faktorskog dizajna za određivanje uslova ekstrakcije

Pri ovim ispitivanjima korišćeni su proizvodi od mesa bez dodate boje. Pre svakog ispitivanja u 1 g uzorka proizvoda od mesa je dodavan standardni rastvor smeše boja, tako da je količina svake boje u uzorku iznosila 10 mg/kg.

Posmatrajući uticaj promene ispitivanih faktora na ekstrakciju pojedinačnih boja, primetno je da porast temperature značajno povećava efikasnost ekstrakcije Košenile i Ponsa 4R, a gotovo da nije imalo uticaj na ekstrakciju Alura crvene AC. Produžavanje vremena ekstrakcionog ciklusa i veći broj ciklusa su povećavali stepen ekstrakcije svih ispitivanih boja. Porast koncentracije amonijum acetatnog pufera pH 7 nije uticao na ekstrakciju Košenile, a smanjivao je efikasnost izolovanja ostalih boja. U donjem redu na slici 16 („Desirability“) su prikazane vrednosti ispitivanih faktora pod uslovima maksimalne ekstrakcije. Primećuje se da kriva funkcije temperature ima maksimum na 99,83 °C, dok za vreme trajanja i broj ponavljanja ciklusa maksimumi nisu dostignuti. Analizom krive funkcije za količinu pufera u metanolu, efikasnost ekstrakcije boja opada sa povećanjem koncentracije pufera. Na osnovu analize primenjenog

eksperimentalnog dizajna dobijene su sledeće vrednosti ispitivanih parametara: temperatura 99,83 °C, vreme 10 min, 3 ciklusa i $1,02 \cdot 10^{-14}$ % amonijum acetatnog pufera u metanolu. Dobijena vrednost za količinu pufera u metanolu je zanemarljiva i u daljim ispitivanjima je korišćen čist metanol.

Pošto je podešavanje temperature ekstrakcije na ekstraktoru moguće samo u celim vrednostima stepena, optimalna temperatura je podešena na 100 °C.

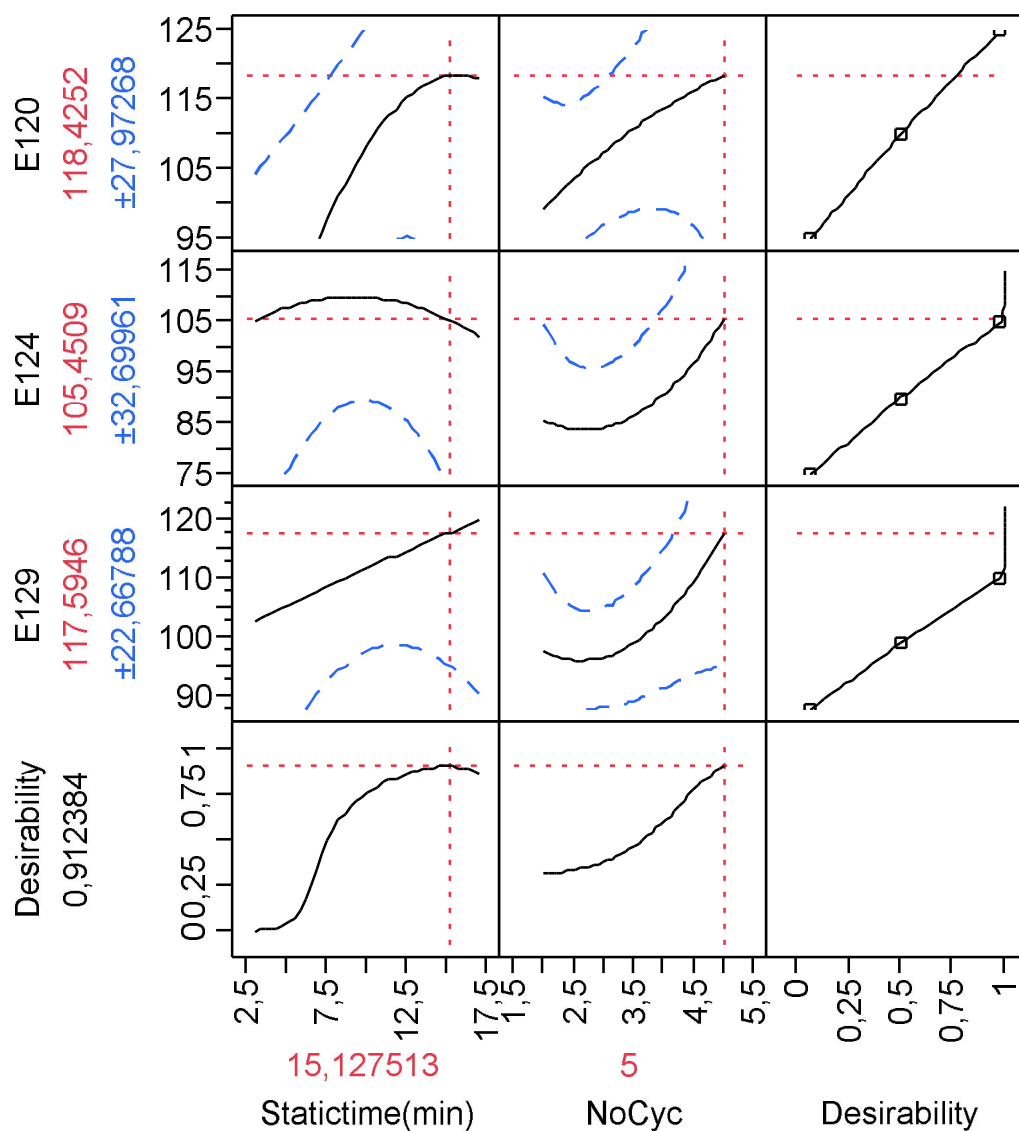
6.5.3. Optimizacija ekstrakcije i kalibracija metode

Za optimizaciju ubrzane ekstrakcije boja na povišenom pritisku i temperaturi izabran je centralni kompozitni eksperimentalni dizajn jer je najpogodniji za ovu vrstu ispitivanja (Ferreira i sar., 2007). Od faktora koji su korišćeni pri ispitivanju procesa ekstrakcije u prethodnoj fazi, za optimizaciju su izabrani vreme trajanja ekstrakcionog ciklusa i broj ekstrakcionih ciklusa (González i sar., 2002). Optimalna vrednost temperature je dostignuta u prvoj fazi, a količinu pufera nije moguće dalje smanjivati. Izabrani faktori za optimizaciju očigledno nisu dostigli maksimalne vrednosti, a analizom faktorskog dizajna je utvrđeno da su značajni za izolovanje sve tri boje iz proizvoda od mesa.

Vrednosti ispitivanih faktora za optimizaciju izolovanja boja ubrzanom ekstrakcijom rastvaračima na povišenoj temperaturi i pritisku su izabrane tako da obuhvate širi interval nego onaj koji je korišćen u prvoj fazi ispitivanja ekstrakcije. Pri izboru ovih faktora uzeto je u obzir da preterano dug proces ekstrakcije (nekoliko časova po uzorku) čini besmislenim ovaj način pripreme uzoraka za tečnehromatografsko određivanje.

Pri ovim ispitivanjima, kao i u prvoj fazi ispitivanja ubrzane ekstrakcije, korišćeni su proizvodi od mesa bez dodate boje kojima je dodavan standardni rastvor smeše boja, istim sadržajem boja (10 µg/ml, odnosno 10 mg/kg preračunato na masu uzorka).

Rezultati optimizacije procesa ekstrakcije boja iz proizvoda od mesa, prikazani u tabeli 26, su obrađeni i grafički prikazani na slici 17.



Slika 17 – Rezultati analize centralnog kompozitnog dizajna za određivanje optimalnih uslova ekstrakcije

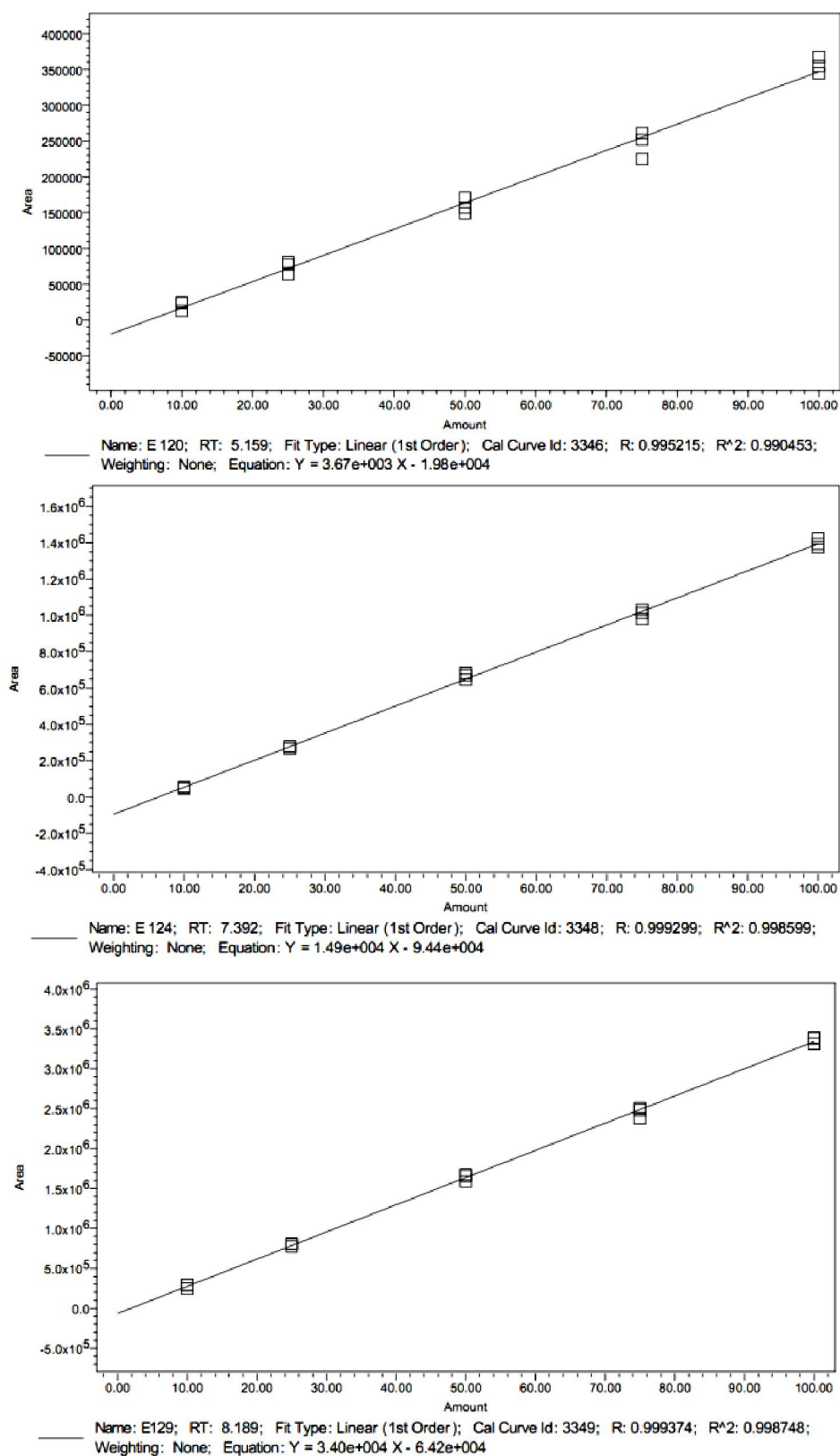
Na osnovu analize prikazanih rezultata optimizacije procesa ekstrakcije za najveći stepen izolovanja sve tri ispitivane boje potrebno je da vreme trajanja jednog ciklusa

bude 15 minuta uz 5 ponavljanja ciklusa. Računajući sve operacije i međukorake koje ekstraktor obavlja (punjenje ćelije za ekstrakciju rastvaračem, zagrevanje, izbacivanje ekstrakta i ubacivanje svežeg rastvarača u ćeliju, ispiranje itd.) ukupno vreme ekstrahovanja po jednom uzorku je oko 85 minuta.

Sumirajući navedene rezultate prve i druge faze ispitivanja ubrzane ekstrakcije rastvaračima može se zaključiti da su za optimalno izolovanje boja iz proizvoda od mesa potrebna 4 ekstrakciona ponavljanja u trajanju od 13 minuta, metanolom, pri temperaturi od 100 °C.

Posle određivanja vrednosti ispitivanih faktora optimizacijom ubrzane ekstrakcije dizajniranjem eksperimenta, izvršeno je podešavanje hromatografskog sistema (kalibracija) i postavljene su metode obrade hromatograma radi pouzdane identifikacije boja i određivanja njihovih količina u uzorcima proizvoda od mesa ispitivanim u daljem istraživanju. Kalibrisanje je izvršeno ispitivanjem serije uzoraka proizvoda od mesa sa dodatim standardnim rastvorom smeše boja. Proizvod od mesa koji je korišćen za ova ispitivanja je bio bez dodatnih boja. Standardni rastvor smeše boja je dodavan u odmerenu količinu uzorka tako da koncentracija boja, računato na masu uzorka, bude 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml i 100 µg/ml. Na taj način su dobijene radne kalibracione prave zavisnosti integrisane površine pika od dodate količine svake od ispitivanih boja. Kalibracione prave su prikazane na slici 18.

Kalibracione prave su preuzete direktno iz programa za akviziciju i obradu hromatograma „Empower“. Koeficijenti determinacije kalibracionih pravih određivanja ispitivanih boja razvijenom metodom tečne hromatografije su $R^2_{E120} = 0,990$, $R^2_{E124} = 0,999$ i $R^2_{E129} = 0,999$. Iz rezultata se jasno vidi da je zavisnost prikazana kalibracionim pravama linearna u celom ispitivanom opsegu. Kalibracijom metode omogućeno je određivanje sadržaja boja u proizvodima od mesa u opsegu od 1 mg/kg do 100 mg/kg proizvoda.

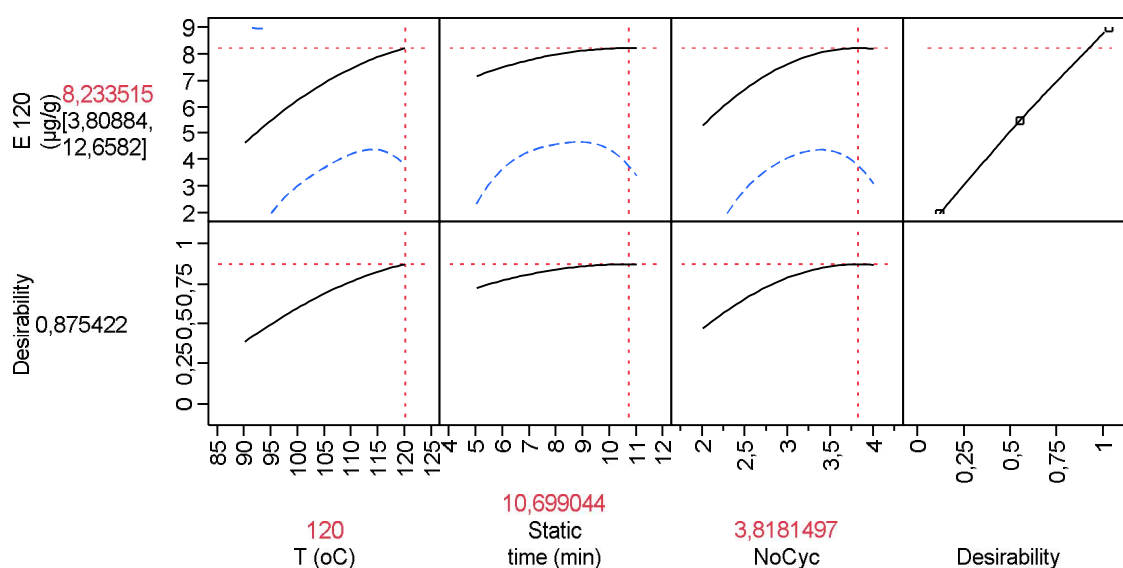


Slika 18 – Radne kalibracione prave Košenile (gore), Ponsa 4R (sredina) i Alura crvene AC (dole)

Kada je primenjen postupak ekstrakcije pod navedenim uslovima za izolovanje boja iz eksperimentalnih proizvoda u kombinaciji sa opisanim postupkom teĥnohromatografskog odreĥivanja, primećeno je da se Košenila ne ekstrahuje potpuno, odnosno da su vrednosti koje su odreĥene niŹe od oćekivanih. Povratni prinosi boja Ponso 4R i Alura crvene AC, pri istim uslovima, su bili oko 100 %. Ova pojava je moguća posledica korišćenja uzoraka kojima je dodavan standardni rastvor boja za optimizaciju ekstrakcije („spajk“). Radi povećanja stepena ekstrakcije Košenile iz eksperimentalnih proizvoda izvršena je nova optimizacija procesa ekstrakcije za koju je primenjen Box-Benkenov eksperimentalni dizajn za optimizaciju tri faktora – temperature, vremena trajanja ekstrakcije i broja ponavljanja ekstrakcija rastvaraćima. Centralni kompozitni dizajn nije pogodan za optimizaciju kada ima više od dva faktora koji se ispituju.

Rezultati optimizacije Box-Benkenovim dizajnom su prikazani u tabeli 28. Analiza rezultata je grafićki prikazana na slici 19.

Prema podacima prikazanim u tabeli 29, samo temperatura pokazuje znaćajan uticaj pri optimizaciji uslova ekstrakcije Košenile iz eksperimentalnih proizvoda od mesa. To, praktićno, znaći da u prethodnim ispitivanjima i optimizaciji procesa ekstrakcije nije postignuta optimalna vrednost temperature.



Slika 19 – Rezultati analize Box-Benkenovog dizajna za odreĥivanje optimalnih uslova ekstrakcije Košenile iz eksperimentalne „pariske kobasice“

Vrednosti temperature i ekstrakcionog vremena su korigovane, tako da je ekstrakcija vršena metanolom na temperaturi od 120 °C u četiri ekstrakciona ciklusa od po 11 minuta. Na ovaj način je ukupno vreme potrebno za ekstrakciju jednog uzorka proizvoda od mesa smanjeno ispod jednog časa. Kada je opisani postupak ekstrakcije primenjen za određivanje boje u eksperimentalnim proizvodima od mesa povratni prinosi su bili zadovoljavajući za sve tri boje kao što je prikazano u sledećem poglavlju.

6.5.4. Određivanje sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima od mesa

Visokoeffikasnom tečnom hromatografijom su izvršena kvalitativna i kvantitativna određivanja boja, u skladu sa laboratorijskim postupkom opisanim u poglavlju 5.5.4. Rezultati prikazani u tabelama 30 i 31 pokazuju da su povratni prinosi boja računato na dodate vrednosti svake boje pri izradi eksperimentalnih proizvoda od mesa prilično visoki, osim u slučaju eksperimentalne „pariske kobasice“ iz proizvodne partije PK04, kod koje je vrednost povratnog prinosa ispod 80 %. Imajući u vidu da je eksperimentalna „pariska kobasica“ proizvedena u industrijskom pogonu gde uslovi proizvodnje eksperimentalnih proizvoda „na malo“ nisu optimalni, ovakav rezultat povratnog prinosa je prihvatljiv.

Kod eksperimentalne „kuvane šunke“, koje su proizvedene u laboratorijskim uslovima, situacija je drugačija. Vrednosti dobijenih rezultata prikazane u tabeli 31 su ujednačenije, povratni prinosi ispitivanih boja se kreću u rasponu od 93,53 % koliko je određeno za sadržaj Košenile od 2,5 mg/kg do 105,20 % za sadržaj boje Alura crvene AC u eksperimentalnim konzervama od mesa. Povratni prinosi određivanja Košenile tečnom hromatografijom su i dalje nešto niži nego pri određivanju Ponsa 4R i Alura crvene AC, ali su svi preko 90 %, što se može smatrati vrlo dobrim rezultatom.

Dobijeni rezultati povratnog prinosa su veći u poređenju sa literaturnim podacima povratnog prinosa Ponsa 4R (76,9 % – 83,6 %) i Alura crvene AC (80,9 % – 84,6 %) koji su dobijeni ubrzanom ekstrakcijom boja iz proizvoda od mesa određivanjem metodom ultra visokoeffikasne tečne hromatografije bez optimizacije ekstrakcije dizajniranjem eksperimenta (Luo i sar., 2012). Validacija literaturne metode je vršena uzorcima proizvoda od mesa kojima je dodavan standardni rastvor smeše boja.

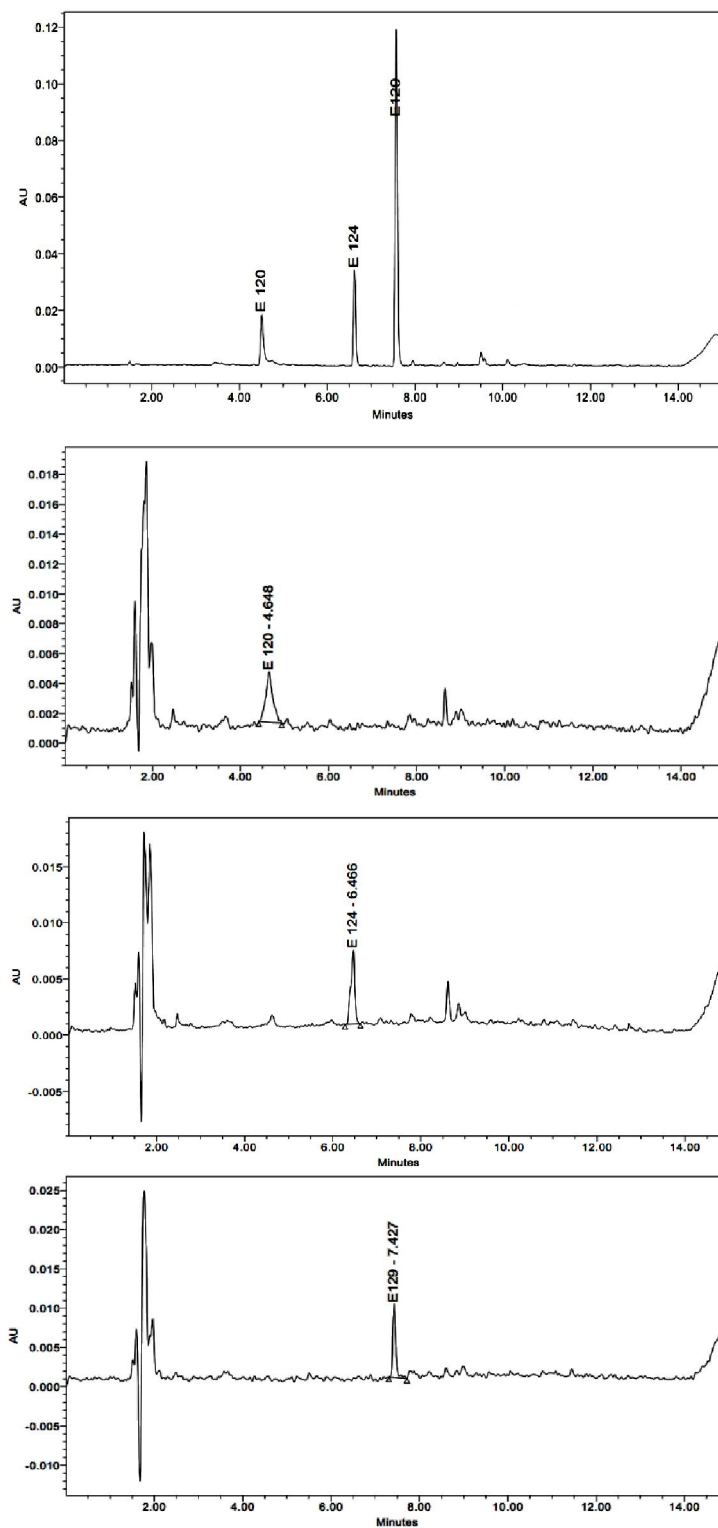
Uočljivo je da postoje razlike između Košenile, sa jedne strane, i Ponsa 4R i Alura crvene AC, sa druge strane, prilikom ekstrakcije i određivanja metodom tečne hromatografije. Razlike postaju razumljive kada se imaju u vidu hemijska svojstva i poreklo ispitivanih boja. Košenila je prirodna boja, karboksilna kiselina, derivat antrahinona za koji je vezan jedan molekul glukoze. Ponso 4R i Alura crvena AC su veštačke, azo boje derivati naftalena. Obe ove boje su sulfonske kiseline. Pošto su u pitanju potpuno različite klase organskih jedinjenja, različito je i njihovo hemijsko ponašanje prilikom ekstrakcije i određivanja metodom tečne hromatografije.

Slika 20 prikazuje hromatograme standardnog rastvora boja i ekstrakta nekih od eksperimentalnih proizvoda.

Prikazani rezultati pokazuju da se razvijena metoda tečne hromatografije za određivanje ispitivanih boja sa ubrzanom ekstrakcijom rastvaračima na povišenom pritisku i temperaturi može uspešno primeniti kod proizvoda od mesa. Metoda omogućava istovremeno određivanje više boja iz istog uzorka, te bi se mogla primeniti za određivanje ispitivanih boja i kod drugih prehrambenih proizvoda posle odgovarajuće kalibracije.

6.5.5. Višestruka linearna regresija rezultata CIE $L^*a^*b^*$ i tečnehromatografskog ispitivanja eksperimentalnih barenih kobasica

Višestruka linearna regresija rezultata merenja boje preseka eksperimentalnih proizvoda i tečnehromatografskog određivanja sadržaja boje u njima je primenjena radi ispitivanja mogućnosti primene CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrije za brzo određivanje dodate boje u proizvodima od mesa. Umesto navedenih količina boje koje su dodate u eksperimentalne proizvode (tabele 3 i 5) korišćeni su rezultati određivanja sadržaja boje metodom tečne hromatografije za dobijanje kalibracionih pravih i linearnih jednačina zavisnosti vrednosti kolorimetrijskih faktora od sadržaja boje. Pretpostavljeno je da su vrednosti količina boja u eksperimentalnim proizvodima određene metodom tečne hromatografije realnije nego navedene vrednosti pogotovo kod eksperimentalnih barenih kobasica koje su proizvedene u industrijskim uslovima.



Slika 20 – Hromatogrami standarda crvenih boja koncentracije 10 µg/ml svake boje (a); ekstrakta eksperimentalnog proizvoda sa Košenilom (b); ekstrakta eksperimentalnog proizvoda sa Ponsom 4R (c) i ekstrakta eksperimentalnog proizvoda sa dodatom bojom Alura crvena AC (d)

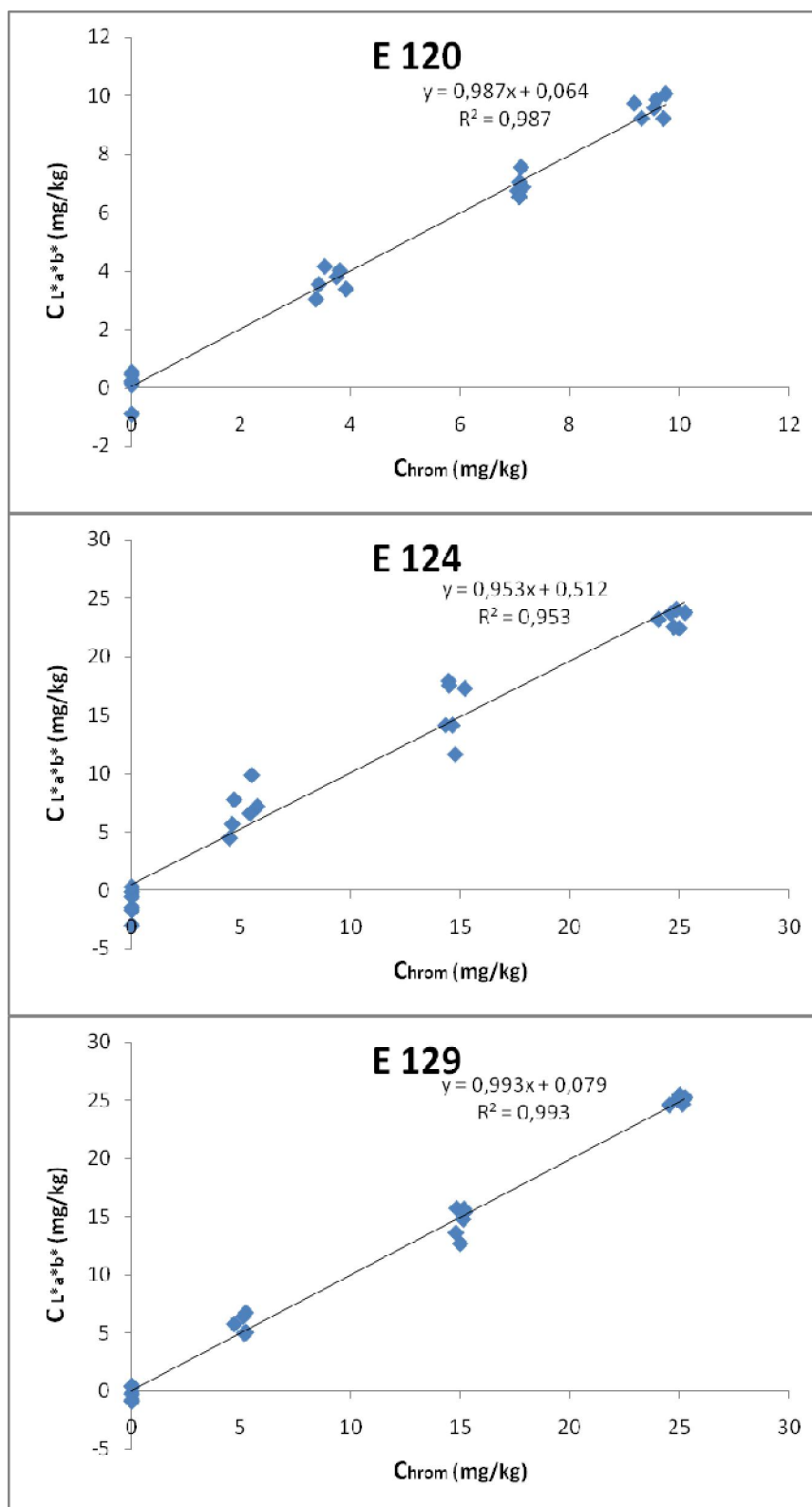
Iz rezultata višestruke linearne regresije, prikazanih u tabeli 32, može se zaključiti, na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije, da se kolorimetrijska ispitivanja mogu primeniti samo kod fino usitnjenih barenih kobasica, odnosno proizvoda od mesa sa homogenom bojom preseka. Najuticajni kolorimetrijski faktor za određivanje sadržaja boje kod svih eksperimentalnih proizvoda je udeo crvene boje, odnosno vrednost a^* . Ovakav zaključak je logičan, jer su dodavane crvene prehrambene boje u proizvode od mesa što je najviše uticalo na promenu vrednosti a^* .

Pošto je utvrđeno da se rezultati kolorimetrijskih ispitivanja eksperimentalnih konzervi od mesa u komadima ne mogu pouzdano primeniti za određivanje sadržaja boje u njima, dalja ispitivanja su se zasnivala na rezultatima kolorimetrijskih ispitivanja eksperimentalnih fino usitnjenih barenih kobasica.

Grafički prikaz provere modela je dat na slici 21.

Jednačine (modeli) zavisnosti koncentracije boje u eksperimentalnim barenim kobasicama određene metodom tačne hromatografije od vrednosti L^* , a^* i b^* preseka proizvoda, dobijene višestrukom regresijom, u polinomskom obliku su navedene u poglavlju 5.5.5. Dobijeni modeli su proveravani unošenjem izmerenih vrednosti L^* , a^* i b^* za svaki proizvod u odgovarajuću jednačinu, izračunavanjem količine boje na osnovu tih vrednosti i poređenjem izračunate količine sa vrednostima sadržaja boje koje su korišćene za dobijanje modela (tabela 33).

Radi pouzdanog poređenja dobijenih rezultata korišćen je dvosmerni t -test za bliske vrednosti standardnih devijacija. Rezultati t -testa prikazani u tabeli 33 pokazuju da, u slučaju boja Košenile i Alura crvene AC, nema značajnih razlika između rezultata hromatografski određene količine boje u eksperimentalnim proizvodima i količine izračunate dobijenom jednačinom (matematičkim modelom). Kod boje Ponso 4R, postoji statistički značajna razlika između vrednosti rezultata za količinu boje od 25 mg/kg. Odstupanje može biti posledica nelinearne zavisnosti koncentracije boje od kolorimetrijskih vrednosti u tom opsegu. Ova ispitivanja su u skladu sa dobijenim vrednostima koeficijenta determinacije jer i t -test i koeficijent determinacije su pokazatelji valjanosti dobijenog modela.



Slika 21 – Provera L*a*b* modela za određivanje sadržaja boja u eksperimentalnim barenim kobasicama

6.5.6. Ispitivanje proizvoda sa tržišta

Metoda visokoefikasne tečne hromatografije sa ubrzanom ekstrakcijom rastvaračima je primenjena za kvalitativno i kvantitativno određivanje boja u uzorcima prisutnim u prodajnim objektima u našoj zemlji. Na slici 22 su grafički prikazani rezultati ispitivanja proizvoda od mesa sa domaćeg tržišta.

Kao što je navedeno u poglavlju 5.5.6., ispitano je 34 proizvoda, od kojih 21 proizvod su bile fino usitnjene barene kobasice, a 13 konzerve od mesa u komadima (slika 22a). Ispitivani su proizvodi raznih proizvođača, iz različitih prodajnih objekata i različitih robnih distributera. Većina proizvoda od mesa je domaćih proizvođača (31 proizvod), a 3 su bila iz uvoza (slika 22b).

Ispitivanjem uzoraka proizvoda od mesa, odnosno fino usitjenih barenih kobasica i konzervi od mesa u komadima, na prisustvo boja pokazalo je da nešto manje od jedne trećine proizvoda ne sadrži ni jednu od ispitivanih boja u količinama koje se mogu odrediti razvijenom metodom. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka, preko polovine je sadržavalo Košenilu, u 12 % je potvrđen sadržaj boje Alura crvene AC, a Ponso 4R nije otkriven ni u jednom proizvodu (slika 22c). Kada se posmatra raspodela uzoraka sa aspekta deklarisanog sadržaja boja u ispitivanim proizvodima, u više od polovine proizvoda je potvrđeno prisustvo dodate boje koja nije deklarirana, a samo u 15 % ispitanih proizvoda je bila deklarirana dodata boja Košenila, E 120. Kao što je već rečeno, nešto manje od jedne trećine ispitanih uzoraka nije sadržavalo dodate boje, te nije bilo potrebe za deklarisanjem (slika 22d).

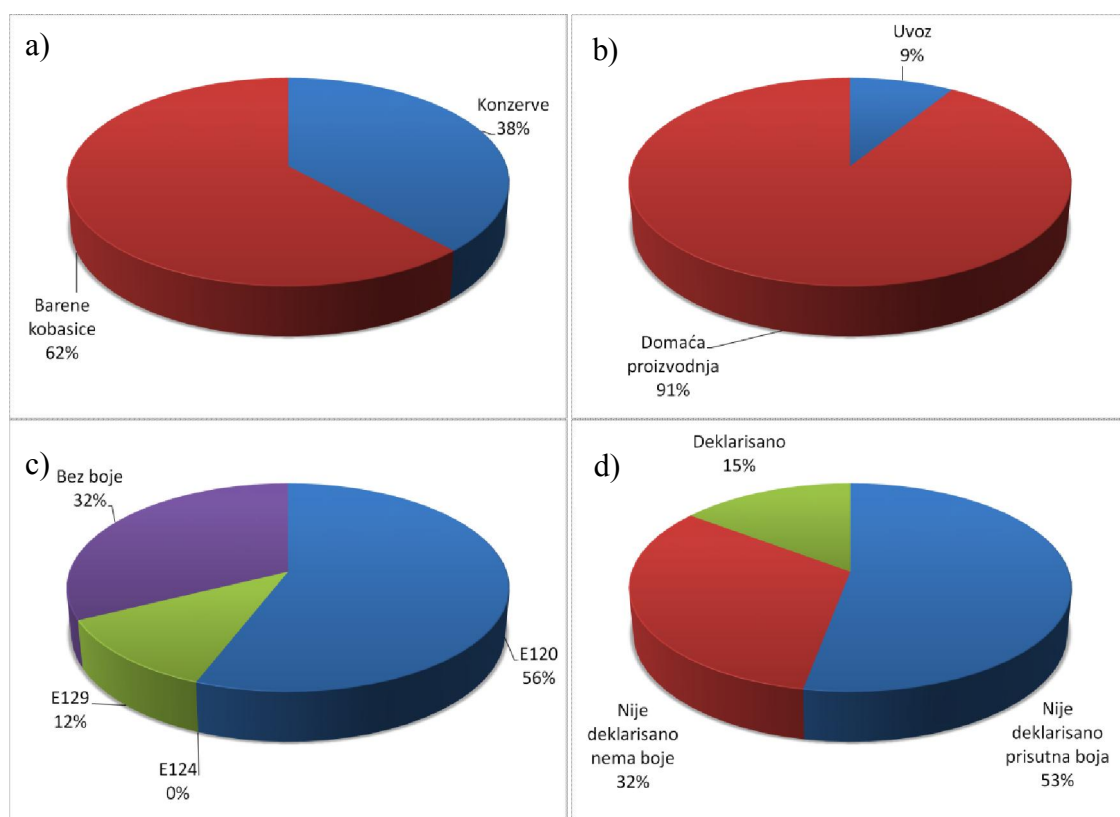
Navedeni rezultati nedvosmisleno govore da je, u trenutku kada je vršeno ovo ispitivanje, kod većine proizvoda koji se nalaze u prometu na domaćem tržištu postojala zakonska nepravilnost, bilo da je u pitanju pogrešno deklarisanje, dodavanje boje u proizvode u kojima nije dozvoljena upotreba bilo koje dodate boje, do upotrebe boja koje su apsolutno nedozvoljene u ispitivanim proizvodima od mesa. Zabeležen je i slučaj da je proizvođač deklarirao prisustvo Košenile u konzervi od mesa u komadima u kojima nije dozvoljeno dodavanje boja. Nedozvoljena upotreba boje Alura crvene AC je potvrđena u 4 ispitana proizvoda. Rezultati ove delimične studije stanja tržišta, sa jedne strane, govore u prilog tome da se u našoj zemlji ne sprovodi dovoljna kontrola

upotrebe boja u proizvodima od mesa. Sa druge strane, upravo ovakva situacija pokazuje koliko je opravdana potreba za pooštavanjem kontrole i za sveobuhvatnijom studijom stanja tržišta kada je u pitanju upotreba boja u proizvodima od mesa. Jedan od glavnih doprinosa kontroli upotrebe boja za bojenje proizvoda od mesa je u razvoju pouzdanih metoda za određivanje dodatih prirodnih i veštačkih prehrambenih boja u proizvodima od mesa, što je tema ove disertacije.

Rezultati primene razvijenih $L^*a^*b^*$ modela na ispitivanim proizvodima od mesa pokazuju da se $L^*a^*b^*$ modelom dobijaju nešto više vrednosti za sadržaj Košenile nego primenom metode tačne hromatografije. Vrednosti sadržaja Košenile u barenim kobasicama dobijene hromatografskim ispitivanjem su bile u intervalu od 2,44 do 4,69 mg/kg, dok su količine izračunate po modelu posle kolorimetrijskih određivanja vrednosti L^* , a^* i b^* boje preseka bile u intervalu od 4,10 do 11,78. Ovakve razlike mogu poticati od brojnih činilaca, na primer, od količine crvene paprike u ekstraktu paprike u proizvodima i dr. Kolorimetrija meri ukupan zbir svih obojenih konstituenata površine preseka, a dodata boja je samo jedan deo tog zbira. Ipak, imajući u vidu da je cilj bio da se proverí da li kolorimetrija može da se primeni za procenu prisustva boje, a ne za precizna određivanja, ovi rezultati su prihvatljivi.

$L^*a^*b^*$ model za određivanje količine boje Alura crvene AC u fino usitnjenim barenim kobasicama pokazuje mnogo bolje slaganje, ali je ispitan vrlo mali broj uzoraka, samo 4, tako da se ne može izvući pouzdan zaključak.

Pošto nije ispitan nijedan uzorak sa dodatom bojom Ponso 4R, model nije bilo moguće proveriti na proizvodima iz prometa. Takođe, $L^*a^*b^*$ model nije primenjen na konzerve od mesa u komadima jer matematički modeli kod eksperimentalnih kuvanih šunki nisu bili validni.



Slika 22 – Grafički prikaz raspodele ispitivanih uzoraka prema vrsti i prisustvu boje u njima

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih istraživanja i dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. eksperimentalni proizvodi od mesa: „pariska kobasica“, kao finousitnjena barena kobasica, i „kuvana šunka“, kao konzerva od mesa u komadima, kojima su u toku izrade dodavane različite količine boja Košenila, Alura crvena AC i Ponso 4R, na osnovu ispitivanih svojstva kvaliteta, reprezentovale su odgovarajuće grupe proizvoda i kao takve bile pogodan supstrat za validaciju novih metoda za određivanje prisustva i količine boja kod proizvoda od mesa;
2. merenjem boje preseka eksperimentalnih proizvoda od mesa sa različitom količinom ispitivanih boja metodom CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrije utvrđene su određene promene $L^*a^*b^*$ vrednosti u odnosu na proizvode bez dodatnih boja:
 - L^* vrednost (intezitet svetlosti) se smanjuje,
 - a^* vrednost (udeo crvene boje) se povećava, i
 - b^* vrednost (udeo žute boje) kod proizvoda sa Košenilom se smanjuje, a kod proizvoda sa veštačkim azo bojama (Alura crvena AC, Ponso 4R) se povećava;
3. ispitivanjem originalnog postupka ubrzane ekstrakcije boja utvrđeno je da se boje efikasno i potpuno ekstrahuju iz proizvoda, što je omogućilo da se razvije nova metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje boja kod proizvoda od mesa, zasnovana na visokefikasnoj tečnoj hromatografiji, kojom se količina boja može odrediti u intervalu od 1,00 do 100,00 mg/kg uzorka;
4. primena eksperimentalnog dizajna u toku ispitivanja optimalnih uslova pri kojima je ubrzana ekstrakcija boja najefikasnija, dala je sledeće rezultate:
 - određena je vrednost temperature (120 °C), sastav rastvarača za

- ekstrakciju i njihov uticaj na ekstrakciju,
- izveden je optimalan broj proba koji je neophodan za ekstrakciju i
 - pripremanje uzoraka je skraćeno u odnosu na referentnu metodu za oko 3 puta, a postupak značajno pojednostavljen i prilagođen rutinskom radu;
5. ispitivanjima su određeni i definisani važniji parametri od značaja za određivanje boja novom metodom tečne hromatografije (sastav i gradijent mobilne faze i optimalne talasne dužine za detekciju boja od 480 do 520 nm), a za razdvajanje i određivanje boja prvi put je korišćena kolona sa stacionarnom fazom od čestica sa čvrstim jezgrom, čijom primenom je postignuto bolje odvajanje hromatografskih pikova boja i značajno povećana osetljivost određivanja Košenile;
6. uporednim merenjem boje preseka proizvoda CIE L*a*b* kolorimetrijom i određivanjem količine boja u proizvodima novom metodom tečne hromatografije, uz primenu višestruke linearne regresije, razvijeni su matematički modeli (formule) koji omogućavaju brzo određivanje prisustva i količine boja CIE L*a*b* kolorimetrijom kod finousitnjenih proizvoda od mesa;
7. primenom novih metoda boje su utvrđene kod 67,65 % ispitanih proizvoda od mesa sa tržišta, i to kod 95 % finousitnjenih barenih kobasica, kod kojih je dozvoljena upotreba prirodnih boja, i kod 23 % konzervi od mesa u komadima, kod kojih je upotreba boja zabranjena; 80 % pozitivnih uzoraka barenih kobasica sadržalo je prirodnu boju Košenilu (2,44 - 4,69 mg/kg), a 20 % uzoraka veštačku boju Alura crvenu AC (19,94 - 74,95 mg/kg); kod konzervi od mesa u komadima utvrđena je Košenila (2,61 - 4,38 mg/kg); Ponso 4R nije utvrđen u ispitivanim uzorcima proizvoda od mesa.

8. SPISAK REFERENCI

1. **Alghamdi, A.H., Alshammery H.M., Abdalla, M.A. and Alghamdi, A.F., 2009.** Determination of Carmine Food Dye (E120) in Foodstuffs by Stripping Voltammetry. *J. AOAC Int.* vol. 92, No. 5.
2. **Altinöz, S., Toptan, S., 2003.** Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 517–530.
3. **Andrzejewska, E., 1981.** Detection of natural organic dye – Cochineal – in meat products. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* (1981), 32(4), 315-318.
4. **Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Flores, J., Guiberteau Cabanillas, C., Villaseñor Llerena, M.J., Contento Salcedo, A., 1998.** Resolution of ternary mixtures of Tartrazine, Sunset yellow and Ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. *Talanta* 46(5) 933-942.
5. **Bozdogan, A., Özgür, M. Ü., Koyuncu, I., 2000.** Simultaneous determination of sunset yellow and Ponceau 4R in gelatin powder by derivative spectrophotometry and partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration. *Analytical letters* 33, 2975-2982.
6. **Carvalho, P.R.N., Collins, C.H., 1997.** HPLC Determination of Carminic Acid in Foodstuffs and Beverages Using Diode Array and Fluorescence Detection. *Chromatographia* Vol. 45, 63-66.
7. **ChemIDplus Advanced via internet, 2007.** Accessible via: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>
8. **Chen, Q., Mou, S., Hou, X., Riviello, J.M., Ni, Z., 1998.** Determination of eight synthetic food colorants in drinks by high-performance ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 827, 73–81.
9. **Combeau, S., Chatelut, M., Vittori, O., 2002.** Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks. *Talanta* 56(1), 115-122.
10. **Corwin, E.; Pines, W. L., 1976,** FDA Consumer April, 18-23.
11. **Dean, J.R., Gouhua, X. 2000.** Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19(9), 553-564.
12. **Dept. of Health and Human Services, FDA 1990.** Federal Register 55(22), 3515-3543.
13. **Dinc, E., Baydan, E., Kanbur, M., Onur, F., 2002.** Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, Tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods. *Talanta* 58, 579-594.
14. **EC, 1994.** Commission Directive 94/36/EC of 30 June 1994. OJ L 237/13, 10.9.94

15. **EC, 2008.** Commission Directive 2008/128/EC of 22 December 2008. OJ L 20, 10.1.2009. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:006:0020:0063:EN:PDF>.
16. **EC, 2008.** Regulation (EC) No 1333/2008 of 16 December 2008. OJ L 354/16, 31.12.2008. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:EN:PDF>.
17. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2009b.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R (E 124) as a food additive. EFSA Journal, 7(11):1328, 39 pp.
18. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2009d.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Tartrazine (E 102). EFSA Journal, 7(11):1330, 45 pp.
19. **EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010.** Scientific Opinion on the appropriateness of the food azo-colours Tartrazine (E 102), Sunset Yellow FCF (E 110), Carmoisine (E 122), Amaranth (E 123), Ponceau 4R (E 124), Allura Red AC (E 129), Brilliant Black BN (E 151), Brown FK (E 154), Brown HT (E 155) and Litholrubine BK (E 180) for inclusion in the list of food ingredients set up in Annex IIIa of Directive 2000/13/EC. EFSA Journal 2010;8(10):1778
20. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2009a.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E 129) as a food additive. EFSA Journal, 7(11):1327, 39 pp.
21. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2009c.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF (E 110) as a food additive. EFSA Journal, 7(11):1330, 45 pp.
22. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2009e.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. EFSA Journal, 7(11):1332, 40 pp.
23. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2010.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Amaranth (E 123) as a food additive. EFSA Journal 2010;8(7):1649
24. **EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), 2011.** Scientific Opinion on the re-evaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. EFSA Journal 2011;9(1):1854
25. **EFSA Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2007.** Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on the food colour Red 2G (E128) based on a request from the Commission related to the re-evaluation of all permitted food additives. EFSA Journal 2007; 515, 1-28
26. **Elhkim MO, Fanny Héraud F, Bemrah N, Gauchard F, Lorino T, Lambré C, Frémy JM and Jean-Poul JM, 2007.** New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine. An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in

- France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47, 308-316.
27. **Favaro, G., et al., 2002.** Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake in solution and painted layers. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, (1): p. 192-197.
 28. **Feingold, B. F., 1975.** *Am. J. Nurs.* 75, 797–803.
 29. **Feingold, B. F., 1968.** *Ann. Allergy* 26, 309–313.
 30. **Ferreira, S. L. et al., 2007.** Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of chromatography A* 1158 (1-2), 2-14.
 31. **Garfield, S., 2000.** *Mauve: How One Man Invented a Color That Changed the World*; Norton: New York.
 32. **Gilman, V., 2003.** *Chem. Eng. News*, August 25, 34.
 33. **Gonzalez, M., Mendez, J., Carnero, M., Lobo, M. G. and Afonso, A., 2002.** Optimizing Conditions for the Extraction of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) Using Response Surface Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6968-6974.
 34. **Hersey, J., Heltzel, C., 2007.** *ChemMatters*, February, 12-15.
 35. **Hopkins, H., 1976.** *FDA Consumer*, November, 5-7.
 36. **Huang, H.Y., Shih, Y.C., Chen, Y.C., 2002.** Determining eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 959, 317–325.
 37. **Hutt, P. B., Hutt, P. B., II., 1984.** *Food, Drug, Cosmet, Law J.* 39, 19.
 38. **Ibero M., Eserverri J.L., Barroso C. and Botey J., 1982.** Dyes, preservatives and salicylates in the induction of food intolerance and/or hypersensitivity in children. *Allergologia et Immunopathologia (Madr)*, 10, 263-268.
 39. **ISO 13496:2000(E), 2000.** Meat and meat products -- Detection of colouring agents -- Method using thin-layer chromatography.
 40. **JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2006.** Combined Compendium of Food Additive Specifications. Monograph 1. Available at: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfaadditives/details.html?id=18>
 41. **JECFA 24th Report, 1980.** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives. WHO Food Additive Series, No. 15.
 42. **JECFA 25th Report, 1981.** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives. WHO Technical Report Series, No. 669.
 43. **JECFA 27th Report, 1983.** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series, No. 18.
 44. **Kirschbaum, J., Krause, C., Bruckner, H., 2006.** Liquid chromatographic quantification of

- synthetic colorants in fish roe and caviar. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 572–579.
45. **Kirschbaum, J., Krause, C., Pfalzgraf, S., Bruckner, H., 2003.** Development and Evaluation of an HPLC-DAD Method for Determination of Synthetic Food Colorants. *Chromatographia*, 57, Suppl.,S-115 S-119.
 46. **Lancaster, F.E., Lawrence J.F., 1996.** High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, a- and b-bixin, and a- and b-norbixin, and the determination of carminic acid in foods. *Journal of Chromatography A*, 732 (1996) 394-398.
 47. **Liao, Q.G., Li, W.H., Luo, L.G., 2012.** Applicability of accelerated solvent extraction for synthetic colorants analysis in meat products with ultrahigh performance liquid chromatography–photodiode array detection. *Analytica Chimica Acta*, 716 (2012) 128-132.
 48. **Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S., Yao, S., 2006.** Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103 170–176.
 49. **McCann, D., Barrett, A., Cooper, C., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., O’Warner, J. Stevenson, J., 2007.** Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370, 1560-1567.
 50. **McKone, H. T. Bull., 1991.** *Hist. Chem.* 10, 25–31.
 51. **Mebane, R. C.; Rybolt, T. R., 1987.** *J. Chem. Educ.* 64, 291–293.
 52. **Merck Index, 2006.** Farbstoffkommission der DFG (Deutschen Forschungsgemeinschaft).
 53. **Mikkelsen, H., Larsen, J.C., Tarding, F., 1978.** *Archives of Toxicology*, Suppl. 1, 141 (as referred to by BIBRA 1982b).
 54. **Minioti, K.S., Sakellariou, C.F., Thomaidis, N.S., 2007.** Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Anal Chim ACTA* 538(1), 103-110.
 55. **Park, H.W., Park, C.H., Park, S.H., Park, J.Y., Park, H.S., Yang, J., Ahn, K.M., Kim, K.H., Oh, J.W., Kim, K.E., Pyun, B.Y., Lee, H.B., Min, K.U., 2008.** Dermatologic adverse reactions to 7 common food additives in patients with allergic diseases: A double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121, 1059-1061.
 56. **Petronijevic, R., Turubatovic, L., Matekalo-Sverak, V., Vranic, D., Jankovic, V., Babic, J., Velebit, B., 2009.** Development and Application of Analytical Methods for Certain Food Additives Determination in Meat Products with the Aim of Consumers’ Protection. *Proceedings: 55th International Congress of Meat Science and Technology, August 2009, Copenhagen, Denmark*, 985-989.
 57. **Pravilnik o prehranbenim aditivima.** Službeni glasnik RS, br. 63/2013.
 58. **Puolanne, E.J., Ruusunen, M.H., Vainionpää, J.I., 2001.** Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate. *Meat Science*,

- 58, 1, 1-7.
59. **Ryvolova, M., Taborsky, P., Vrabel, P., Krasensky, P., Preisler, J., 2007.** Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1141, 206–211.
 60. **Sáenz, C., Garrido, J., Carvallo M., 2004.** Colorantes Naturales Derivados de la Cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), in *La Alimentacion Latinoamericana*. p. 56-62.
 61. **SCF, 1984.** Reports of the Scientific Committee for Food (14th series), opinion expressed 1983, 47-61.
 62. **SCF, 1984.** Reports of the Scientific Committee for Food (14th Series), opinion expressed on 7 July 1983, 53. Available at: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_14.pdf
 63. **SCF, 1989.** Reports of the Scientific Committee for Food (21st series), opinion expressed on 10 December 1987. Available at: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_21.pdf
 64. **Sharma, V., McKone, H.T., Markow, P.G., 2011.** A Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. *Journal of Chemical Education*, Vol. 88 No. 1.
 65. **SRPS ISO 1442 1998.** Meso i proizvodi od mesa, Određivanje sadržaja vlage (referentna metoda).
 66. **SRPS ISO 1443 1992.** Meso i proizvodi od mesa, Određivanje sadržaja ukupne masti.
 67. **SRPS ISO 2917 2004.** Meso i proizvodi od mesa, Merenje pH (referentna metoda).
 68. **SRPS ISO 6558 2001.** Senzorske analize, Metodologija, Opšte uputstvo.
 69. **SRPS ISO 936 1999.** Meso i proizvodi od mesa, Određivanje ukupnog pepela.
 70. **SRPS ISO 937 1992.** Meso i proizvodi od mesa, Određivanje sadržaja azota (referentna metoda).
 71. **Supramaniam, G., Warner, J.O., 1986.** Artificial food additive intolerance in patients with angio-oedema and urticaria. *Lancet*, 2, 907-909.
 72. **TemaNord, 2002.** Food additives in Europe 2000; Status of safety assessments of food additives presently permitted in the EU. *TemaNord*, 560, 116-121.
 73. **Vachirapatma, N., Mahajaroensiri, J., Visessanguan, W., 2008.** Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography. *Journal of Food & Drugs Analysis* 16, 77-82.
 74. **Weber, R.W., Hoffman, M., Raine, D.A. Jr., Nelson, H.S., 1979.** Incidence of bronchoconstriction due to aspirin, azo dyes, non-azo dyes, and preservatives in a population of perennial asthmatics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64, 32-37.
 75. **Yamada, S., Noda, N., Mikami, E., Hayakawa, J., 1993.** Analysis of natural coloring matters in food. 4. Methylation of Cochineal color with diazomethane for the analysis of food products. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1071-1075.

76. **Yoshioka, N., Ichihashi, K., 2008.** Determination of 40 synthetic colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. *Talanta*, 74, 1408-1413.

BIOGRAFIJA

mr Radivoj Petronijević, diplomirani hemičar

Rođen 13.3.1968. godine u Zemunu.

Osnovno i srednje obrazovanje stekao u Zemunu.

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao školske 1986/87. godine, a redovne studije započeo školske 1987./88. godine, po odsluženju vojnog roka.

Diplomski rad pod nazivom "Ispitivanje hemijskog sastava biljke *Teucrium Chamaedris*" radio na Katedri za organsku hemiju iz oblasti Strukturnih instrumentalnih metoda analize. Diplomirao 8.9.1992. godine sa prosečnom ocenom na redovnim studijama **8,21** (osam dvadeset jedan) i ocenom **10** (deset) na diplomskom ispitu, čime je stekao zvanje diplomirani hemičar opšte hemije i uslov za upis poslediplomskih studija.

Poslediplomske studije upisao školske 1992./93. godine na Katedri za analitičku hemiju.

Magistarski rad pod nazivom "Kinetička metoda za određivanje tragova selena" odbranio 14.10.1997. godine na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i stekao zvanje magistar hemijskih nauka.

Od 01.10.1992. do 31.08.1994. je bio zaposlen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 01.09.1994. do 02.09.2001 zaposlen na Institutu za nuklearne i druge mineralne sirovine (ITNMS) u Beogradu u Laboratoriji za analitičku hemiju.

Od 15.07.2005. radi u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Odeljenju za određivanje rezidua veterinarskih lekova. Sistematizacijom od 01. 12. 2009. raspoređen je u Odeljenje za hemijska ispitivanja.

Objavio je 12 naučnih radova i više od 20 saopštenja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Радивој Петронијевић

број уписа Кандидат има магистратуру

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Испитивање могућности примене нових метода за контролу употребе природних и вештачких боја код производа од меса“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 01.11.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Радивој Петронијевић

Број уписа Кандидат има магистратуру

Студијски програм Кандидат има магистратуру

Наслов рада „Испитивање могућности примене нових метода за контролу
употребе природних и вештачких боја код производа од меса“

Ментор проф. др. Илија Вуковић, редовни професор (у пензији)

Потписани Радивој Петронијевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 01.11.2013.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Испитивање могућности примене нових метода за контролу употребе природних и вештачких боја код производа од меса“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 01.11.2013.

Потпис докторанда