

Uloga spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) u analizi hrane

Lastovčić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:579079>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Maja Lastovčić

7129/N

Uloga spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) u analizi hrane

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za Organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

Uloga spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR) u analizi hrane

Maja Lastovčić, 0058207351

Sažetak: Kvalitativna i kvantitativna analiza hrane omogućuje prehrambenim tehnologizima plasiranje kvalitetnog, ujednačenog i ispravnog proizvoda na tržište. Razvoj industrijske proizvodnje hrane zahtijeva i razvoj analitičkih metoda za procjenu kvalitete namirnica. NMR-spektroskopija idealan je alat za takve analize jer je brza metoda, nedestruktivna prema analiziranom uzorku i jednostavna za korištenje. Magnetsko rezonancijsko oslikavanje (MRI) je metoda koja se zasniva na NMR i omogućuje praćenje promjena u strukturi namirnica kroz sve faze proizvodnje. Rezultati dobiveni pomoću ovih metoda izvor su informacija pomoću kojih se optimiziraju svi koraci u proizvodnji hrane.

Ključne riječi: autentičnost, bioaktivne molekule, konzerviranje, NMR-analiza hrane

Rad sadrži: 30 stranica, 17 slika, 1 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Prof. dr.sc. Lidija Barišić

Datum obrane: 9. rujan 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Diverse application of nuclear magnetic resonance (NMR) in food analysis

Maja Lastovčić, 0058207351

Abstract: Food technology requires both qualitative and quantitative food analysis in order to place quality, balanced and accurate products on the market. The development of industrial food production is based on the development of analytical methods for the assessment of food quality. NMR-spectroscopy is fast, non-destructive to the analyzed sample and it's easy to use and therefore is the ideal tool for food analysis. NMR-based MRI method allows us to monitor changes in the structure of foods through all phases of production. The results obtained by these methods are the source of information by which all steps in food production are optimized.

Keywords: authenticity, bioactive molecules, preservation, NMR analysis of food

Thesis contains: 30 pages, 17 figures, 1 table, 58 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Lidija Barišić, PhD, Full Professor

Defence date: September 9th, 2019

SADRŽAJ

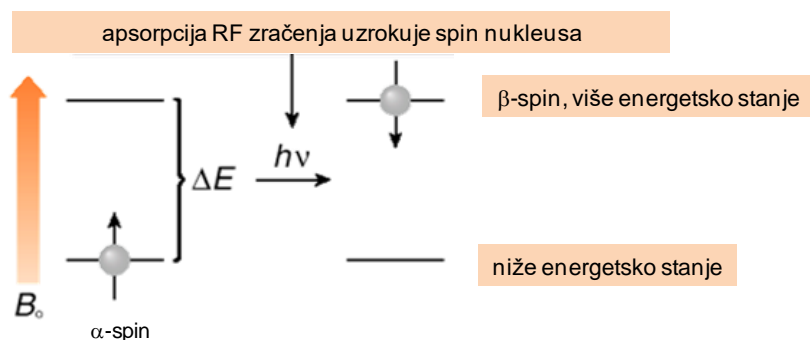
| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Primjena NMR u prehrambenoj industriji..... | 2 |
| 2.1.1. Primjena MRI u prehrambenoj industriji..... | 3 |
| 2.2. Strukturna analiza hrane..... | 4 |
| 2.2.1. Voda..... | 4 |
| 2.2.1.1. Metode suzbijanja signala vode..... | 5 |
| 2.2.2. Masti i masne kiseline..... | 6 |
| 2.2.2.1. Potvrđivanje točnosti i preciznosti metode..... | 7 |
| 2.2.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza masti i ulja..... | 7 |
| 2.2.3. Proteini i aminokiseline..... | 9 |
| 2.2.3.1. Praćenje promjena u aminokiselinskom profilu..... | 10 |
| 2.2.3.2. Identifikacija na temelju kemijskih pomaka..... | 11 |
| 2.2.4. Ugljikohidrati..... | 11 |
| 2.2.4.1. Škrob..... | 12 |
| 2.2.4.2. Prehrambena vlakna..... | 13 |
| 2.2.4.2.1. Karagenan..... | 13 |
| 2.2.4.2.2. Pektini..... | 14 |
| 2.3. Određivanje bioaktivnih molekula i tvari arome..... | 16 |
| 2.3.1. Kontrola medicinskih biljnih pripravaka..... | 16 |
| 2.3.2. Alkoholna pića..... | 16 |
| 2.3.3. Kava..... | 17 |
| 2.3.4. Zeleni čaj..... | 17 |
| 2.4. Kontrola autentičnosti namirnica..... | 19 |
| 2.4.1. Med..... | 19 |
| 2.4.2. Maslinovo ulje..... | 20 |
| 2.5. Identifikacija GM proizvoda..... | 20 |
| 2.6. Kontrola metoda konzerviranja..... | 21 |
| 2.7. Kontrola mikrobiološke kontaminacije..... | 22 |
| 2.8. Kontrola ambalaže..... | 23 |
| 3. ZAKLJUČAK..... | 25 |
| 4. LITERATURA..... | 26 |

1. UVOD

Primjena spektroskopskih tehnika u prehrambenoj industriji sve je češća, jer rezultati proizašli iz spektroskopskih mjerenja olakšavaju proces proizvodnje i distribucije hrane. Prehrambena industrija teži proizvodima koji su ujednačene kakvoće, higijenski ispravni i ne djeluju štetno na zdravlje potrošača. To je moguće postići primjenom najnovijih znanstvenih spoznaja i metoda u analizi hrane. Spektroskopske tehnike su neinvazivne, brze, jeftine i precizne (Matijević i Blažić, 2008).

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) jedna je od najčešće korištenih i najpreciznijih analitičkih tehnika za dobivanje podataka o molekulskom sastavu organskih i anorganskih molekula.

Atomske jezgre s neparnim atomskim brojem (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P) nakon izlaganja jakom vanjskom magnetskom polju B_0 pretežito se orijentiraju u pravcu tog polja (α -spin, stabilniji položaj). Nakon izlaganja radiofrekventnom (RF) zračenju frekvencije koja odgovara razlici između energetski povoljnijeg α -spina i nepovoljnijeg β -spina, dolazi do izvrtanja jezgre iz α - u β -spin, slijedi relaksacija i ponovno usmjeravanje u pravcu polja pri čemu se emitira elektromagnetski signal kojeg bilježi NMR-spektrometar. S obzirom da vodikovi atomi u organskim molekulama imaju različito kemijsko okruženje, odnosno okruženi su elektronima koji ih svojim lokalnim magnetskim poljima više ili manje zasjenjuju, njihova se rezonancija događa pri poljima različite jakosti, odnosno imaju različite kemijske pomake (slika1) (Barišić, 2018).



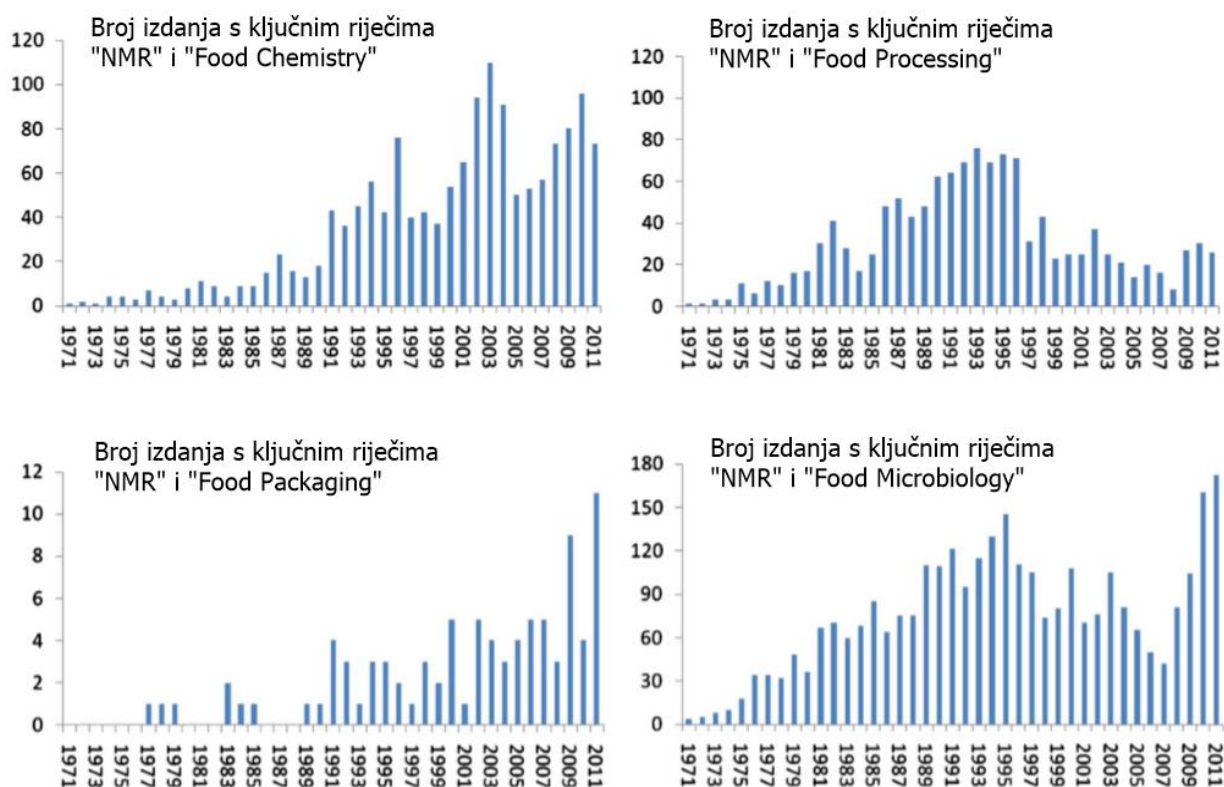
Slika 1. Rezonancija (Barišić, 2018).

U ovom će se radu opisati različite primjene NMR u analizi hrane, raspraviti o prednostima i nedostacima ove tehnike te navesti moguće primjene u prehrambenoj industriji u budućnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Primjena NMR u prehrambenoj industriji

S korištenjem NMR radi određivanja strukture organskih molekula započelo se 40-ih godina prošlog stoljeća (Gutowsky i sur., 1949). Međutim, s korištenjem NMR u u analizi hrane započelo se 40-ak godina kasnije, ponajviše zbog nedostatka educiranih stručnjaka, skupe opreme i neprilagođenosti postojećih NMR-spektrometara takvim vrstama analize. Posljednjih se godina, zahvaljujući razvoju i unapređenju uređaja, NMR sve češće koristi u prehrambenoj tehnologiji kao i u znanstvenim istraživanjima koja se bave analizom sastava hrane (slika 2).



Slika 2. Primjena NMR u raznim područjima znanosti o hrani. Pretraživanje provedeno pomoću platforme "ISI Web of Science" u razdoblju od 1971-2011. godine (Marcone i sur., 2013).

U analizi hrane koristi se NMR niske rezolucije (engl. *Low Resolution* NMR, LR-NMR) i NMR visoke rezolucije (engl. *High Resolution* NMR, HR-NMR). Uređaji za LR-NMR pristupačniji su i jednostavniji za korištenje, ali zahtijevaju referentne metode za kvantitativna mjerenja. Metoda HR-NMR je skuplja, ali su zato dobiveni rezultati točniji i detaljniji (Butorac i sur., 2013).

U prehrambenoj industriji NMR se koristi u više svrha: (i) analiza kemijskog sastava, (ii) strukturna identifikacija funkcionalnih sastojaka, (iii) određivanje sastava ambalaže, (iv)

ovjeravanje autentičnosti, (v) optimizacija parametara procesiranja te (vi) kontrola mikrobiološke, fizikalne i kemijske kvalitete hrane.

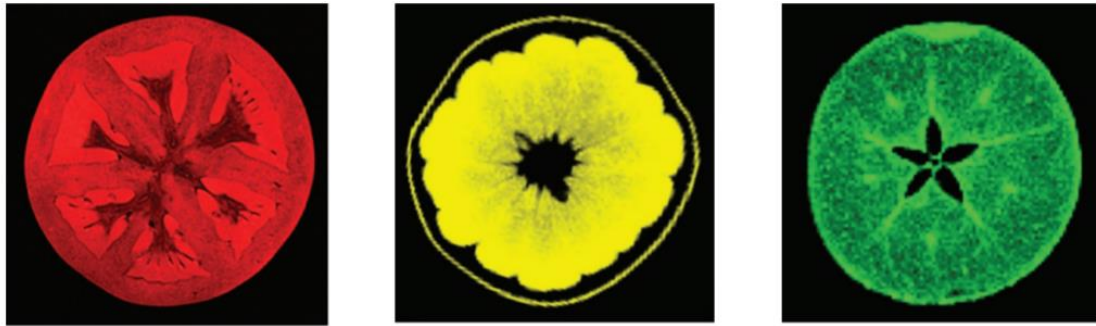
NMR kao metoda analize koristi se i u forenzici hrane za: (i) određivanje kakvoće ulja (posebice maslinovog ulja), piva, kave, zelenog čaja, mliječnih proizvoda, mesa i ribe, (ii) utvrđivanje razlike u tkivu namirnica životinjskog podrijetla, (iii) određivanje stupnja zrelosti povrća, (iv) analizu udjela prirodnog soka u mješavinama (Butorac i sur., 2013), (v) utvrđivanje zemljopisnog podrijetla te senzorskih svojstva namirnica, npr. pojedinih sorti grožđa i vina (Rocfort i sur., 2010), itd.

Magnetsko rezonancijsko oslikavanje (engl. *Magnetic resonance imaging*, MRI) metoda je koja se temelji na principima NMR i koristi se za točno određivanje prostorne raspodjele molekula u tkivima. Ovisno o pripadajućem tkivu, protoni su izloženi različitim lokalnim magnetskim poljima. Razlika u okolnom tkivu očituje se različitim nuklearnim rezonancijskim frekvencijama uslijed izlaganja jakom vanjskom magnetskom polju. Rezonancijska frekvencija protona, osjetljiva na lokalno magnetsko polje, lako se može izmjeriti te se pomoću računala određuje položaj protona odnosno rekonstruira oblik tkiva (Brnjac-Kraljević i sur., 1999).

2.1.1. Primjena MRI u prehrambenoj industriji

Metoda MRI isprva se primjenjivala samo u medicini, a danas ima primjenu u raznim područjima, pa tako i u analizi hrane. MRI se koristi u svrhu dobivanja podataka o sastavu namirnica kao i za praćenje promjena u strukturi hrane koje su rezultat berbe, zrenja, skladištenja, procesiranja i obrade namirnica. Korištenjem ove metode dobivamo vrijedne podatke o kvaliteti namirnica koje nisu vidljive na temelju senzorskih svojstva kao što su veličina, boja i tekstura (Chayaprasert i Strohine, 2005).

Dobivena slika nastaje praćenjem dviju vrijednosti: longitudinalne relaksacije (T1) – vrijeme potrebno za povratak longitudinalnog magnetizma na 63% početne vrijednost i transverzalna relaksacija (T2) - vrijeme potrebno za nestanak transverzalnog magnetizma, tj. pad na 37% početne vrijednosti. Kontrast dobivenih slika često je rezultat distribucije i sadržaja vezane i slobodne vode u namirnicama čija relaksacijska vremena i dobiveni signali ovise o mikrostrukturi okolnih tkiva (slika 3) (Schill, 1992).



Slika 3. Primjeri presjeka plodova rajčice, limuna i jabuke (s lijeva na desno) dobivenih pomoću MRI (Van Duynhoven, 2017).

Većina istraživanja provodi se na konvencionalnim NMR-spektrometrima niske ili visoke rezolucije s posebno dizajniranim mikročitačem koji se koristi za uzorke promjera do 3 cm (Van Duynhoven, 2017).

2.2. Strukturna analiza hrane

Ugljikohidrati, masti, proteini i voda daju energetska i nutritivna vrijednost hrani te utječu na svojstva hrane tokom procesiranja, skladištenja i transporta (Marcone i sur., 2013). S obzirom da sadrže znatne količine vodikovih i/ili ugljikovih atoma, $^1\text{H-NMR}$ - i $^{13}\text{C-NMR}$ -spektroskopija omogućuju analizu njihovog kemijskog sastava.

2.2.1. Voda

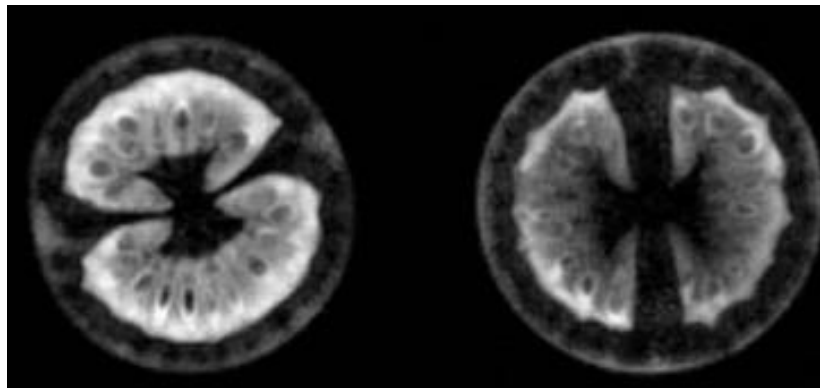
Voda je jedan od glavnih sastojaka hrane. Sudjeluje u izgradnji biljnih i životinjskih tkiva te u brojnim metaboličkim procesima. U hrani se nalazi u slobodnom ili vezanom obliku. Preradom hrane mijenja se količina i karakter vezane vode, što utječe na svježinu i trajnost proizvoda, s obzirom da je voda medij nužan za rast mnogih mikroorganizama (Belton, 2011). Spektroskopske metode često se koriste za određivanje vode u hrani. Signal koji odašilju molekule vode služi određivanju fizikalnih (raspodjela) i kemijskih (pokretljivost, molekulske interakcije) svojstava vode.

Rezultati dobiveni NMR-spektrometrijom analize količine vode u određenim vrstama mesa potvrđuju točnost, preciznost i valjanost ove metode. Analiza sastava vode u govedini, piletini i svinjetini (40,42%, 74,37% i 73,75%) potvrđuje službene podatke (40,39%, 74,57% i 73,94%) koje je objavila Udruga službenih analitičkih kemičara (AOAC, engl. *Association of Official Analytical Chemists*) (Keeton i sur., 2003).

Uzastopnim snimanjem istog uzorka pomoću MRI metode dobivamo informacije o kretanju vode u namirnici, odnosno promjenama količine vode kao i vezama u kojima sudjeluje.

Dobivene promjene ukazuju na zrelost, oštećenja, truljenje i ostale faktore koji su vezani uz kvalitetu hrane. Te promjene mogu biti uzrokovane i drugim faktorima kao što su okolišni čimbenici u kojima su voće i povrće uzgojeni ili tip procesa prerade kojem je proizvod podvrgnut (Butz i sur., 2005).

Jedan od primjera je promjena koncentracije vode u „*Pachino cherry*” rajčicama uzgojenim u različitim godišnjim dobima. Razlika u sadržaju i raspodjeli vode u rajčicama utječe na njihov vijek trajanja i potrebne uvjete skladištenja (Ciampa i sur., 2010). Na morfološke karakteristike i sadržaj vode u plodu utječu i mjesto uzgoja te sorta rajčice. Dvije vrste rajčica, *cv. Naomi* i *cv. Shiren*, iako sličnih veličina i izgleda, razlikuju se u kemijskom sastavu (slika 4), pri čemu se najveća razlika vidi u debljini perikarpa (sjemenog omotača), omjeru dvaju tkiva koja ga tvore i sadržaju vode. Tamna područja na slici označavaju područja koja su siromašna protonima odnosno vodom (Sequi i sur., 2007).



Slika 4. MRI-prikaz dviju vrsta rajčice [*cv. Naomi* (desno) i *cv. Shiren* lijevo)] (Sequi i sur., 2007).

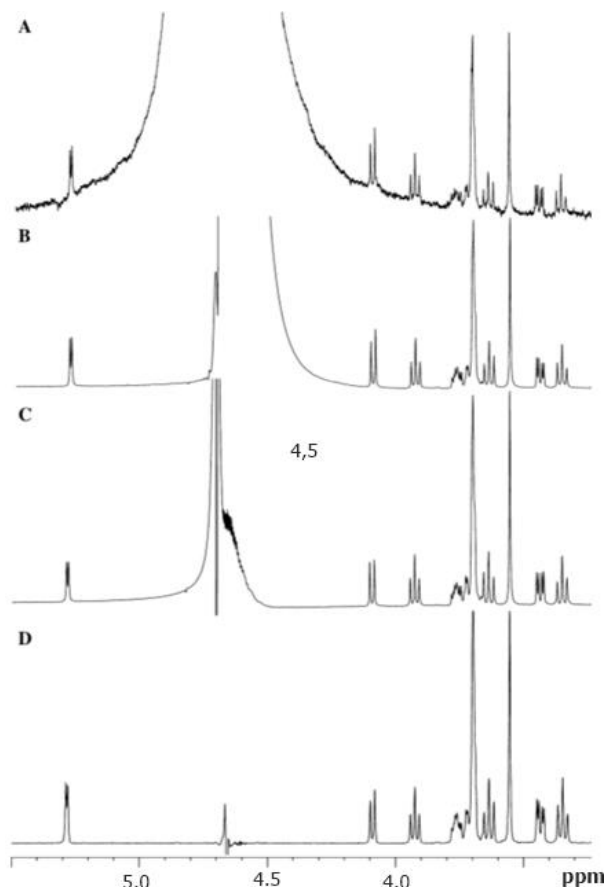
2.2.1.1. Metode suzbijanja signala vode

Signal dobiven pomoću MRI direktno je proporcionalan količini vode u uzorku, osim u slučajevima kada analizirani uzorak sadrži velike koncentracije masnih kiselina. Međutim, u većini slučajeva signal otapala, koje je najčešće voda, zasjenit će signale ostalih sastojaka hrane (Marccone i sur., 2013). Kako bi se to spriječilo koriste se različite metode poput prezasićenja otopine, te WATERGATE i PURGE (Prezasićenost postignuta koristeći gradijente relaksacije i odjeka, engl. *Presaturation utilizing relaxation gradients and echoes*) (Simpson i sur., 2005).

Metoda prezasićenja otopine temelji se na korištenju selektivnog pulsa male snage kako bi se zasitila rezonancija otapala. Neselektivni puls širokog spektra primjenjuje se na preostalom

spinovima kako bi ih smjestili u ravninu pogodnu za detekciju. Prednosti ove metode su to što je jeftina, brza i jednostavna. No, dobivena slika manje je jasna i precizna od slika dobivenih drugim metodama (Marccone i sur., 2013).

Primjerice, WATERGATE metoda koja je skuplja, daje puno jasniju sliku. Korištenjem ove metode utječe se na redoslijed i vrijeme potrebno za pojavu difuzije i relaksacije atoma te na inverziju signala otapala (Zheng i sur., 2008). To je moguće ostvariti primjenom jakog pulsa od 180° , nakon čega slijede dva slabija pulsa od 90° ili kombinacijom 3-9-19 ($3\alpha-\tau-9\alpha-\tau-19\alpha-\tau-19\alpha-\tau-3\alpha$, $26\alpha=180^\circ$, τ =vrijeme odgode dobivanja signala). Produljimo li vrijeme dobivanja signala za $125\ \mu\text{s}$ proširujemo inverzijski profil čime dolazi do supresije rezonancija sličnih onom koje daje otapalo. Kraćim djelovanjem vidljivost rezonancija molekula sličnih otapalu je bolja, ali je manja vidljivost ostalih signala. Metoda koja je prema jednostavnosti i cijeni najbližnja metodi prezasićenja otopine, ali daje puno jasniju i kvalitetniju sliku je PURGE (Simpson i sur., 2005). Zasniva se na korištenju početnog 90° pulsa nakon kojega poslije vremena potrebnog za inverziju primjenjujemo jedan ili više 180° pulseva. Dobiveni intenzitet signala opada s vremenom i ponovno se pojavljuje daljnjim korištenjem 180° pulsa. Time se postiže dulje vrijeme dobivanja signala koje omogućuje prikupljanje većeg broja podataka o analiziranom uzorku. Dobivena slika temelji se na različitim T2 vrijednostima (slika 5) (Schill, 1992).



Slika 5. $^1\text{H-NMR}$ spektar uzorka dobivenog otapanjem saharoze u smjesi H_2O i D_2O (90:10). (A) Bez suzbijanja signala vode, (B) korištenjem metode prezasićenja, (C) korištenjem 3-9-19 WATERGATE metode i (D) koristeći PURGE (Simpson i sur., 2005).

2.2.2. Masti i masne kiseline

Prehrambena ulja i masti važan su izvor energije kao i esencijalnih masnih kiselina, poput linolne i α -linolenske kiseline. Prenose tvari arome, doprinose teksturi i nosioci su vitamina topljivih u mastima, sterola, kolesterola, fosfolipida i brojnih ostalih fitokemikalija. Unos masti povezuje se s različitim utjecajima na zdravlje čovjeka, najčešće s ulogom u razvoju i prevenciji kardiovaskularnih bolesti, pri čemu najvažniju ulogu imaju one masne kiseline koje unosimo prehranom. Masti su esteri triju masnih kiselina i trovalentnog alkohola glicerola. Struktura i funkcija ovih molekula je promjenjiva i ovisi o duljini molekule, broju nezasićenih veza i njihovom položaju u molekuli (Consonni i sur., 2008). Ukupan sadržaj masti (eng. *Solid fat content*, SFC), odnosno omjer tekućih i čvrstih masti pri određenim temperaturama kao i sastav masnih kiselina faktori su koji utječu na određena svojstva namirnica: mazivost, čvrstoću, okus, pogodnost za procesiranje i stabilnost (Marccone i sur., 2013). Zato je analiza sastava masti u hrani od velikog značaja u prehrambenoj industriji.

2.2.2.1. Potvrđivanje točnosti i preciznosti metode

Plinska kromatografija metoda je koja se često koristi u određivanju i analizi masnih kiselina. Iz tog razloga često se koristi kao referentna metoda u usporedbi rezultata dobivenih pomoću NMR. Miyake i sur. (1998) usporedili su rezultate dobivene pomoću ^{13}C NMR (300 MHz) i plinske kromatografije u analizi sastava *n*-6 polinezasićenih masnih kiselina u palminom, maslinovom, šafrankovom i kukuruznom ulju. Rezultati dobiveni NMR analizom (11,2%, 14,3%, 43,7% i 60,2%) vrlo su bliski onima dobivenim pomoću plinske kromatografije (13,5%, 15,5%, 44,9% i 60,6%) (Miyake i sur., 1998).

Osim plinskom kromatografijom, rezultati dobiveni pomoću NMR često se uspoređuju i s drugim metodama. Primjerice, analizom udjela masti u govedini, piletini i svinjetini dobiveni su sljedeći rezultati: 46 %, 7,15% i 3,88%. Analizom udjela masti u istim uzorcima pomoću Soxhlet ekstrakcije (AOAC službena metoda 960.39) dobiveni su slični rezultati: 45,84%, 7,24% i 3,74%, čime je ponovno potvrđena preciznost NMR-spektrometrije (Keeton i sur., 2003).

Rezultati ^1H NMR-analize masti u uzorku mlijeka uz zasićenje signala vode ($3.6 \pm 0.1\%$) u korelaciji su s vrijednostima izmjerenima Rose-Gottlieb metodom - gravimetrijskom metodom kojom se analizira sastav masti nakon ekstrakcije pomoću dietil-etera (Hu i sur., 2007).

2.2.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza masti i ulja

Pomoću NMR moguće je i odrediti sastav masti u mesu određenih genotipova životinja. Razlike u sastavu odnose se na količinu kolesterola, zasićenih i nezasićenih masnih kiselina i

sadržaju masti u određenim dijelovima tijela. Prema dobivenim rezultatima vrši se selekcija i odabir životinjskih vrsta s poželjnim karakteristikama (Jaturasitha i sur., 2008)

NMR se pokazala kao valjana i precizna metoda za analizu, kvantifikaciju i karakterizaciju masti u prehrambenim proizvodima. Iz tog razloga 1993. godine priznata je kao AOCS (Američko društvo za kemiju ulja, engl. *American Oil Chemist's Society*) službena metoda za određivanje ukupnog sadržaja masti (Marcone i sur., 2013)

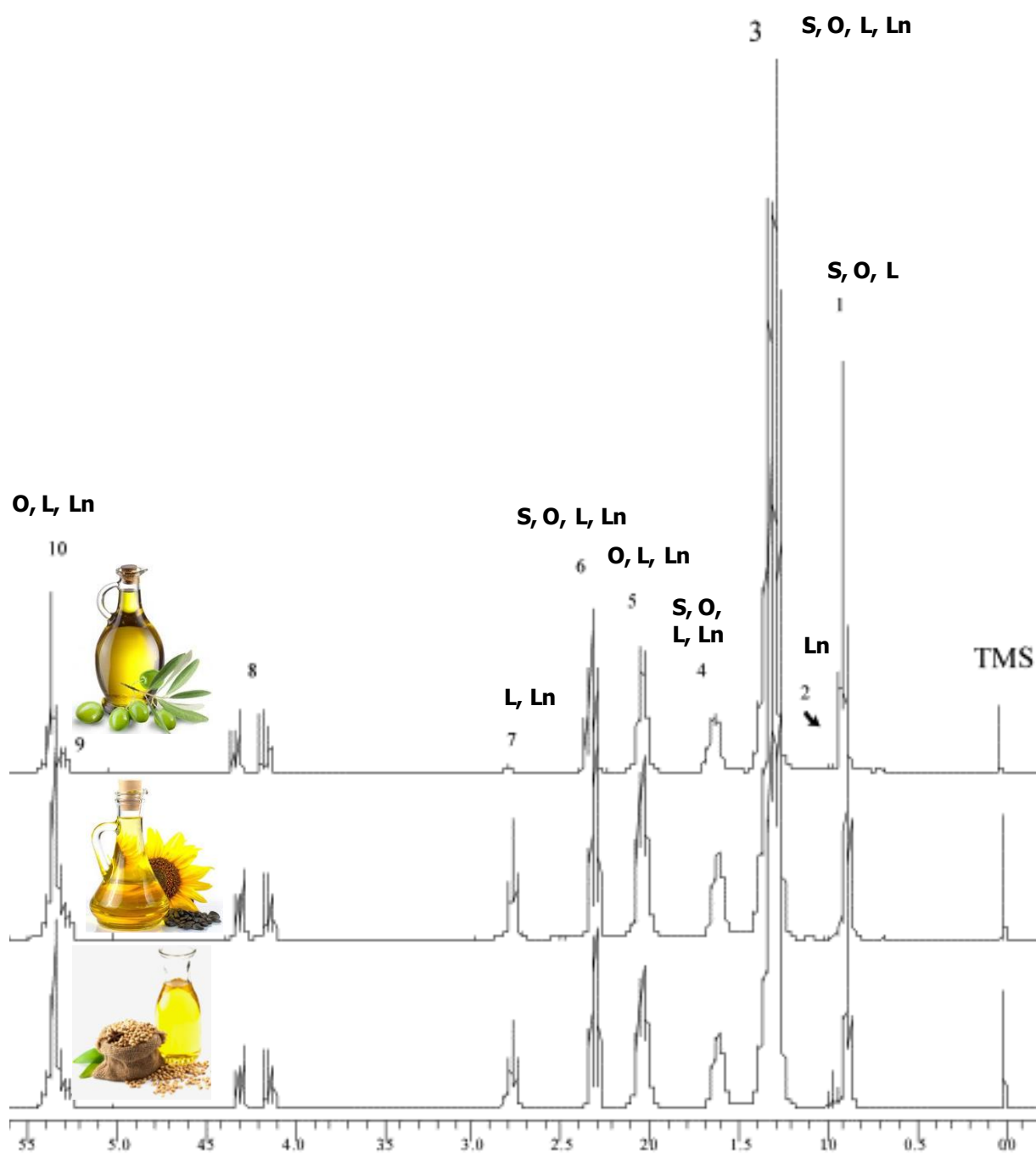
Praćenje količine nusprodukata nastalih tokom skladištenja ulja uslijed izlaganja svjetlosti i visokim temperaturama omogućuje nam procjenu razine oksidacije ulja i njegove stabilnosti. Naime, nastali vodikov peroksid detektira se u ^1H NMR spektru signalom čiji intenzitet odgovara njegovoj količini.

Omjer zasićenih i nezasićenih veza utječe na fizikalna i kemijska svojstva ulja i masti. Kako bi se odredio sastav nezasićenih veza u uzorak se dodaje jod koji se adira na dvostruku vezu. Dodana količina joda proporcionalna je broju nezasićenih veza. Klasične metode određivanja joda su dugotrajne. No, korištenjem ^1H NMR za detekciju metilenskih skupina nastalih adicijom joda proces se znatno ubrzava i rezultati su u skladu s AOCS podacima.

^1H NMR koristi se i za određivanje acilnih protona pomoću kojih možemo identificirati sastav masnih kiselina u mastima i uljima. Slika 6. prikazuje ^1H NMR spektre maslinovog, suncokretovog i sojinog ulja mjerene pri 300 MHz. Kemijski pomaci njihovih acilnih skupina (signali 1 i 2), javljaju se u području 1 - 0,80 ppm (signali 3-10 pripisuju se metilenskim i metilenskim protonima iz hidrofobnih repova). Takve informacije o sastavu masti od velikog su značaja prehrambenih tehnologizama i nutricionistima jer određene masne kiseline, kao što su omega-3-masne kiseline, pozitivno utječu na oksidacijsku stabilnost proizvoda i zdravlje čovjeka (slika 6) (Guillén i sur., 2001).

Masne kiseline imaju svojstvo pojave nepoželjnih strukturnih defekata kao što je kristalizacija. Kristalizacija se očituje tvorbom zrnatih granula koje utječu na teksturu, senzorska svojstva i smanjen rok trajanja proizvoda. Masne kiseline mogu tvoriti tri vrste polimorfa: nestabilniji α -polimorf i stabilnije β - and β' -polimorfe. ^1H -NMR omogućuje razlikovanje između α - i β -polimorfa mjerenjem T1 i T2 relaksacijskih vremena (Adam-Berret i sur., 2008).

Budući da nijedna metoda nije savršena, kombinacija NMR i ostalih analitičkih metoda daje najbolje rezultate. Primjer tomu je kombinacija NMR i metode sušenja mikrovalovima (eng. *micro-oven drying method*) u određivanju količine vlage i masti u sirovom i prerađenom mesu. Pokazalo se da su tako dobiveni rezultati puno dosljedniji onima dobivenim AOAC službenim metodama (Guillén i sur., 2001).



Slika 6. ^1H NMR spektri maslinovog, suncokretovog i sojinog ulja. Oznake S, O, L i Ln odnose se na zasićene masne kiseline kao i na oleinsku, linolnu i linolensku nezasićenu masnu kiselinu (Guillén i sur., 2001).

2.2.3. Proteini i aminokiseline

Proteini izgrađuju naša tkiva i doprinose pravilnoj funkciji imunostava. Razlikuju se s obzirom na strukturu i broj konstitutivnih proteinogenih aminokiselina (tzv. aminokiselinski profil). Naš ih organizam ne može sve sintetizirati, pa tako postoji devet esencijalnih

(fenilalanin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan i valin) i dvije uvjetno esencijalne aminokiseline (arginin i histidin). Za razliku od ostalih makronutrijenata tijelo ne može pohraniti aminokiseline i zato ih je bitno osigurati svakodnevnom prehranom (Wolfe i sur., 2018). Aminokiselinski profil utječe na različite karakteristike namirnica bogatih proteinima, poput nutritivne vrijednosti, probavljivosti, termičke stabilnosti i funkcionalnih svojstava. ¹H NMR metodom možemo odrediti količinu proteina i aminokiselinski profil uzorka te pratiti promjene u aminokiselinskom sastavu tokom procesiranja namirnica (Marccone i sur., 2013). Takvi podaci su iznimno važni zbog činjenice da esencijalne aminokiseline mogu reagirati na promjene temperature i pH-vrijednosti namirnica tokom procesiranja i skladištenja, ali i ulaziti u reakcije s ostalim dodanim sastojcima. Rezultat toga može biti smanjena bioraspoloživost aminokiselina, a ponekad i smanjena mogućnost probave proteina (Hurrell i sur., 1983.)

2.2.3.1. Praćenje promjena u aminokiselinskom profilu

Izlaganjem namirnica različitim temperaturama i pH-vrijednostima dolazi do promjena u njihovom aminokiselinskom sastavu. Na nutritivnu vrijednost namirnica utječe i proces zrenja koji je karakterističan za određenu vrstu hrane.

Zrenjem sira dolazi do promjena u njegovim kemijskim i fizikalnim svojstvima te enzimskom sastavu i aktivnosti enzima. Time dolazi i do promjena u aminokiselinskom profilu sireva. Consonni i Cagliani (2008) dokazali su da se zrenjem talijanskog *Parmigiano Reggiano* sira smanjuje udio leucina i izoleucina, a povećava udio treonina. Koncentracija i sadržaj određenih aminokiselina i masnih kiselina faktor je koji utječe na specifičnu aromu određenih sorti sireva (Consonni i Cagliani, 2008).

Consonni i sur. odredili su kemijski sastav *Amarone* vina pomoću ¹H-NMR na temelju različitih kemijskih pomaka metinskih protona kao i protona iz bočnih ogranaka (slika 7).

Postmortalno zrenje mesa proces je koji utječe na njegov aminokiselinski profil. Pomoću ¹H NMR moguće je detektirati promjene u sastavu aminokiselina, nukleotida i šećera u mesu nakon sazrijevanja. Priprema uzorka za provođenje ove metode je jednostavna i zahtijeva minimalan trud. Njome je također dokazano da je tokom ovog procesa povećana razina proteolize mesa koja u konačnici dovodi do promjene u njegovoj teksturi (Hererro i sur., 2007).

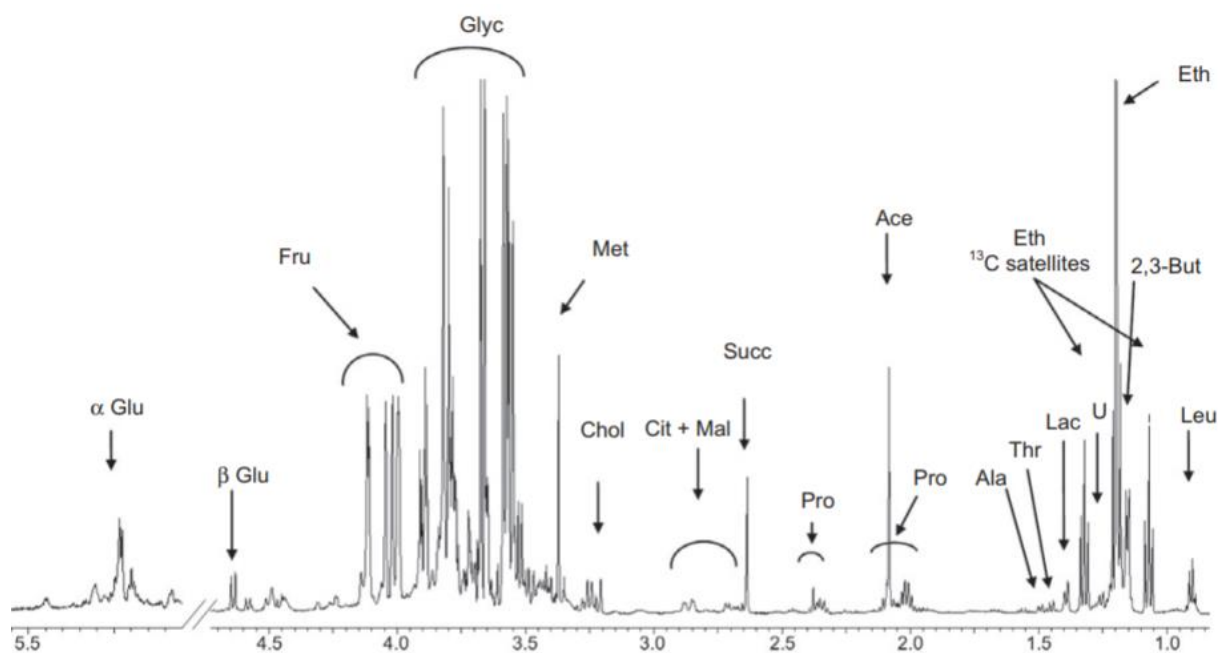
2.2.3. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati se dijele prema stupnju polimerizacije na monosaharide, disaharide, oligosaharide i polisaharide. U monosaharide koje najčešće nalazimo u prehrani spadaju glukoza, fruktoza i galaktoza, a u disaharide saharoza i laktoza. U polisaharide spadaju škrob i prehrambena vlakna (celuloza, hemiceluloza, gume, ljepila i pektini). Sadržaj navedenih vlakana određuje kvalitetu i teksturu voća i povrća. Probavljivi ugljikohidrati izvor su energije (glukoze) za naše stanice, a neprobavljivi omogućuju brojne korisne fiziološke učinke kao što su poželjan utjecaj na imunitet i probavu. U prehrambenoj industriji ugljikohidrati se razlikuju s obzirom na slatkoću, teksturu, probavu, stupanj apsorpcije u organizmu te utjecaj na viskoznost, stabilnost i posmeđivanje proizvoda (Štalić i sur., 2016).

2.2.3.1. Mono- i disaharidi

Sadržaj mono- i disaharida moguće je odrediti pomoću $^1\text{H-NMR}$ (slika 7). Kemijski sastav „*Amarone*“ vina određen je asignacijom aminokiselinskih metinskih protona kao i protona iz bočnih ogranaka: leucin (0,88, 1,44 i 3,37 ppm), treonin (1,42 i 4,38 ppm), alanin (1,45 i 3,65 ppm), prolin (2,01, 2,08, 2,35, 3,38 i 4,11 ppm) te i kolin pri 3,20 ppm. Ovom metodom moguće je identificirati i druge sastojke. Signali glicerola i etanola smanjeni su korištenjem selektivnog pulsa namijenjenog supresiji širem rasponu otapala. Ipak, očitani su i njihovi signali pri 1,19 i 3,66 ppm (etanol) te 3,57, 3,66 i 3,78 ppm (glicerol). Od šećera dominira signal fruktoze pri 4,11, 4,04, 3,82 i 3,66 ppm koji je 56 puta jači od signala saharoze očitnog pri 5,45 i 3,83 ppm i 3 puta jači od signala glukoze [α -anomer] i 4,64 ppm (β -anomer)]. Temeljeno na standardnoj bazi podataka pretpostavlja se da je signal koji se preklapa s α -glukozom pri 5,24 ppm arabinoza dok se signali pri 5,26 i 5,19 ppm pripisuju galaktozi, odnosno trehalozi i ksilozi. Signal pri 1,15 ppm predstavlja 2-butandiol (slika 7) (Consonni i sur., 2011).

Praćenje promjena u sastavu aminokiselina, ali i ostalih sastojaka kao što su šećeri i aromatske molekule, značajne su u kontroli kvalitete proizvoda (Marcone i sur, 2013). Belton i sur. (1996) koristili su NMR kako bi odredili omjer arginina i alanina u raznim vrstama grožđa. Dobiveni omjer iznosio je 1:1.8 i podudara se sa objavljenim vrijednostima dobivenim drugim metodama. Sličnu podudarnost dobili su analizom soka od naranče i grejpa (Belton i sur., 1996).



Slika 7. ^1H -NMR spektar dobiven analizom uzorka „Amaroné” vina (Consonni i sur., 2011).

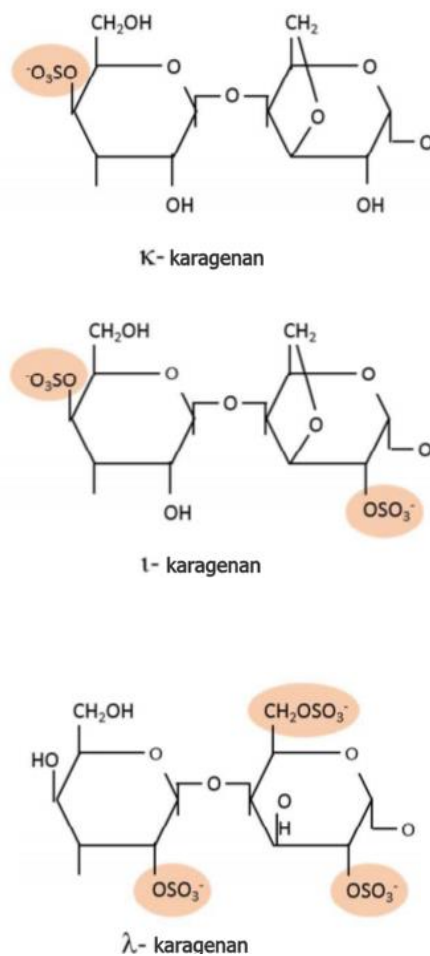
2.2.4.1. Škrob

Škrob je polisaharid koji se u biljkama pojavljuje u obliku zrnaca. Sastoji se od dvije frakcije građene iz glukoze; amiloze (25%, nerazgranati lanac) i amilopektina (75%, razgranati lanac). Pomoću NMR-spektrometrije moguće je odrediti botaničko podrijetlo škroba iz hrane na temelju vrsta kristala koje tvori. Razlikujemo kristale tipa A, B C i V. Tip A čini amilopektin s kratkim bočnim lancima i bliskim mjestima grananja lanaca. Nalazi se u proizvodima od kukuruza, pšenice i riže. Tip B sadrži amilopektin s dužim bočnim ograncima i udaljenijim mjestima grananja, a nalazimo ga u proizvodima od voća i gomolju. Kristali tipa C mješavina su tipova A i B, a nalazimo ih u leguminozama. Tip V je posebna vrsta koja obilježava škrob koji je izdvojen iz modificiranog škroba ili iz prirodno prisutnog škroba iz škrobnih zrnaca endosperma. Modificirani škrob se koristi u prehrambenoj industriji jer je stabilniji pri raznim temperaturama i utjecajima kiselina nego nativni škrob, a jednako se probavlja i apsorbira. Pomoću ^{13}C -CP/MAS-NMR-spektroskopije (75,46 MHz) moguće je odrediti vrstu prisutnih kristala. Osim otkrivanja botaničkog podrijetla škroba, ova metoda može se koristiti za praćenje promjena u strukturama kristala škroba kroz procese obrade namirnica (Therien-Aubin i Zhu, 2009). Izlaganjem otopljenog škroba povišenim temperaturama dolazi do geliranja. U reakcije geliranja može ulaziti i s drugim sastojcima hrane kao što su glukoza, saharoza i ksantan guma. Pomoću NMR-spektroskopije možemo pratiti promjene u strukturi škroba nakon dodatka ostalih sastojaka i aditiva (Gonera i Cornillon, 2002).

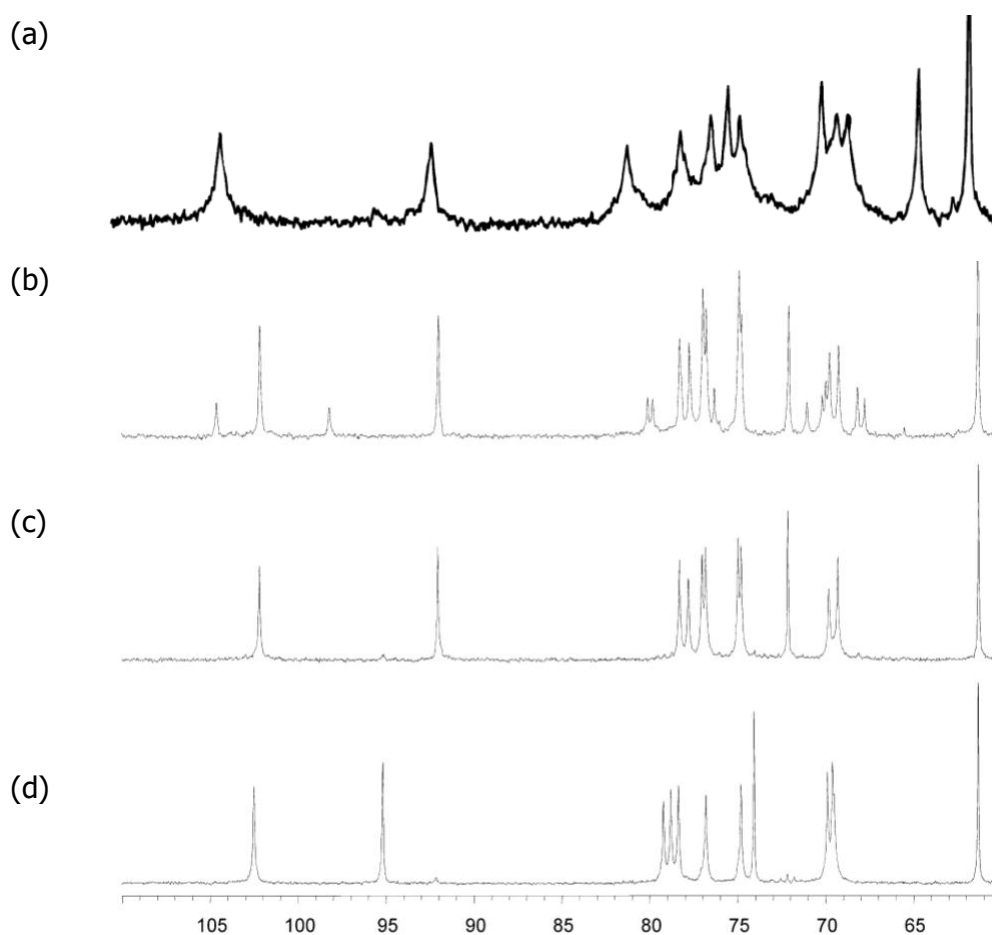
2.2.3.2. Prehrambena vlakna

2.2.3.2.1. Karagenan

NMR-spektroskopija koristi se za analizu i određivanje prisutnih struktura karagenana u proizvodima. Karagenan je sulfatirani polisaharid izoliran iz jestivih crvenih algi koji se u prehrambenoj industriji često koristi kao emulgator, zgušnjivač i konzervans. Čest je sastojak vegetarijanske i veganske prehrane jer se koristi kao zamjena za želatinu. Postoji šest vrsta karagenana [Iotta (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (ν) i Theta (θ) karagenan], od čega se tri najčešće koriste u prehrambenoj industriji: Kappa-karagenan koji tvori čvrste gelove u prisustvu kalijevih iona, Iotta-karagenan koji tvori slabije gelove u prisustvu kalcijevih iona i Lambda-karagenan koji ne tvori gel, ali djeluje kao zgušnjivač (slika 8). Mehanizam djelovanja karagenana još nije u potpunosti razjašnjen i stoga postoje podijeljena mišljenja o sigurnosti njegove upotrebe (Shlomit i sur., 2018). Kvalitetna analiza i praćenje strukturnih promjena tokom procesiranja ovog sastojka u interesu su proizvođačima i potrošačima. Ovakve analize nam omogućuju razumijevanje industrijskih i komercijalnih vrijednosti ovog, ali i drugih dodanih sastojaka hrane. Podaci dobiveni iz ovakvih analiza omogućuju proizvođačima da na tržište stavljaju kvalitetan i ujednačen proizvod. Pomoću ^{13}C -NMR moguće je detektirati i razlikovati identificirane vrste karagenana (slika 9) (van de Velde i sur., 2002).



Slika 8. Prikaz vrsta karagenana koje se najčešće koriste u prehrambenoj industriji (Shlomit i sur., 2018).



Slika 9. ^{13}C -NMR spektri glavnih tipova karagenana izoliranih iz različitih vrsta alga. Odozdo prema gore: (a) κ -karagenan iz alge *Kappaphycus alvarezii*; (b) ι -karagenan iz alge *Eucheuma denticulatum*; (c) ν/ι hibrid karagenana koji sadrži 25% ν -karagenana; (d) λ -karagenan iz alge *Iridaea undulosa* (van de Velde i sur., 2002).

2.2.3.2.2. Pektini

Pektini su heteropolisaharidi složenog sastava. Nalazimo ih u staničnim stijenkama i središnjoj lameli biljaka, odnosno plodova. Upotreba pektina kao funkcionalnog sastojka je široko rasprostranjena, a koristi se kao prirodni stabilizator, zgušnjivač te sredstvo za želiranje i povećanje volumena. Koncentracija pektina u određenom voću, kao što su na primjer jabuke, određuje njegovu konzistenciju. Tako zrenjem jabuke mekšaju zbog zamjene struktura postojećih pektina esterificiranim oblicima koji su topljivi u vodi. Marcon i sur. (2005) analizirali su ekstrakte pektina dobivene iz jabuka. Dobivene ekstrakte podijelili su u tri frakcije prema vremenu potrebnom za ekstrakciju kao i temperaturi pri kojoj je provedena (tablica 1).

Tablica 1. Ekstrakti pektina podijeljeni prema temperaturi i vremenu dobivanja

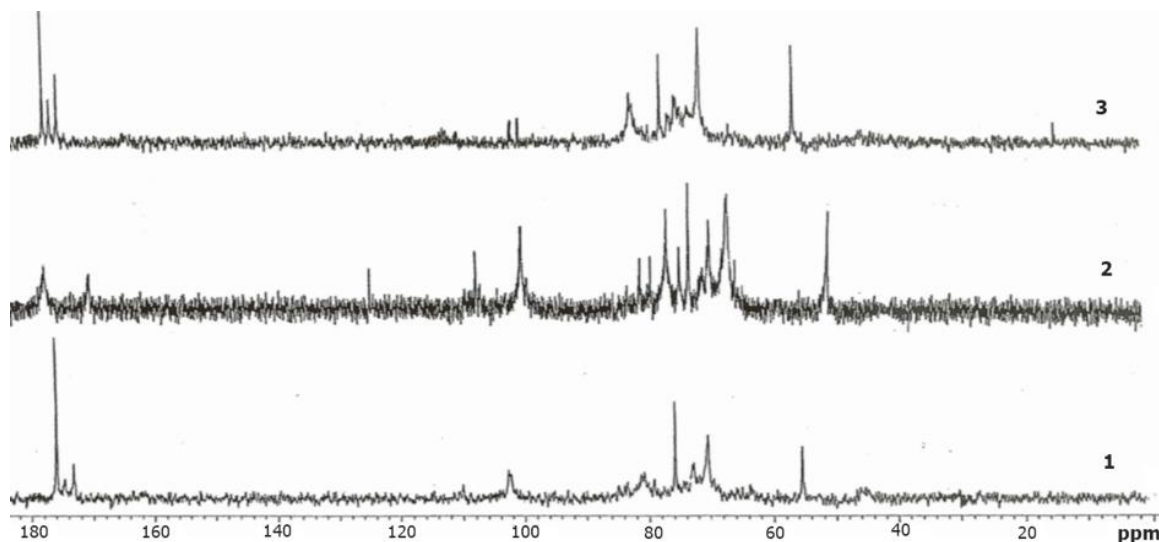
| Frakcija | Temperatura (°C) | Vrijeme (min) |
|----------|------------------|---------------|
| 1 | 50 | 30 |
| 2 | 100 | 30 |
| 3 | 100 | 80 |

Primjenom NMR-spektroskopije moguće je odrediti sadržaj pektina u plodovima te njihov stupanj esterifikacije (Marcon i sur., 2005). ¹³C-NMR-spektrometrijom dobiveni su podaci o pektinskom sastavu frakcija:

Frakcija 1: β-ksilopiranozil, galakturonska kiselina i α-arabinofuranozil (102,4, 102,7 i 110, ppm), α-arabinofuranozil (80,2, 83,4 i 63,7 ppm), esterificirani (176,0 ppm) i neesterificirani (170 ppm) oblik galakturonske kiseline, O-metil esteri (55,4 i 3,36 ppm), ramnoza (3,2 ppm) i galakturonska kiseline (4,81, 3,65, 4,30, 4,43 ppm).

Frakcija 2: esterificirani (178,5 ppm) i neesterificirani (170,6 ppm) oblik galakturonske kiseline, esterificirane karboksilne skupine galakturonske kiseline (52,9 ppm), α-arabinofuranozil i galakturonska kiselina (100,1 i 107,6 ppm) i fenolni spojevi (125,4 ppm).

Frakcija 3: galakturonska kiselina i β-ksilopiranozil (100,6 i 102,1 ppm), esterificirane (175,6 ppm) i neesterificirane (172,9 ppm) karboksilne skupine, ramnopiranozil (18,7 ppm), O-metil skupina karboksi-metil estera (55,1 ppm), galakturonska kiselina (4,81, 4,99, 3,75, 4,14, 4,32 i 4,49 ppm) i metilni esteri (3.68 i 3.67 ppm) (slika 10).



Slika 10. ¹³C-NMR spektri pektinskih frakcija 1, 2 i 3 (Marcon i sur., 2005).

2.3. Određivanje bioaktivnih sastojaka i tvari arome

NMR/MRI može se koristiti kako bi se odredili sastojci arome povezani s kvalitetom proizvoda. Njome se može ispitati difuzija komponenata arome (primjerice etil-butanoata i linalola) u raznim gelovima. Rezultati ovakvih studija objašnjavaju utjecaj strukturnih i teksturalnih promjena na aromu i okus hrane (Gostan i sur., 2004).

2.3.1. Kontrola medicinskih biljnih pripravaka

NMR-spektroskopija može se koristiti u kontroli medicinskih biljnih pripravaka pomoću identifikacije njihovih specifičnih bioaktivnih sastojaka. Pomoću LC-NMR (sprega tekućinske kromatografije i NMR) i off-line NMR-a uspješno su identificirani derivati flavonoida i elagične kiseline u četiri vrste rosike (*D. anglica*, *D.intermedia*, *D.madagascariensis* i *D. rotundifolia*) koja se često koristi u tretiranju bolesti dišnih puteva. Kvalitativni i kvantitativni rezultati dobiveni ovom metodom od velikog su značaja u pripremi ovakvih pripravaka zbog toga što pojednostavljaju način pripreme uzorka, a metoda je jeftina i jednostavna. Zehl i sur. (2011) preporučuju NMR-spektroskopiju kao metodu za kontrolu kvalitete biljnih pripravaka u budućnosti (Zehl i sur., 2011).

2.3.2. Alkoholna pića

Budući da su etanol, voda i octena kiselina glavni sastojci vina, pomoću NMR možemo pratiti promjene u njihovom omjeru i sastavu u vinima. Time je omogućeno praćenje nastalih promjena i pojave kvarenja vina. Praćenjem koncentracija sadržaja octene kiseline, jednostavnih šećera, fenola i elemenata u tragovima moguće je odrediti kvalitetu vina. Ovakvom vrstom analize uzorak koji ispituje ostaje nepromijenjen (Weekley i sur., 2003).

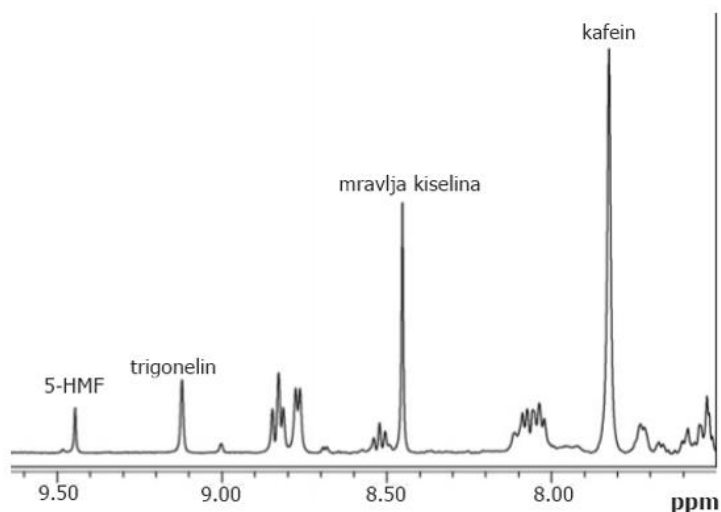
Sprezanjem NMR i ATR (FT-IR Fourier Transform Infrared Spectroscopy Technique, Fourier-ova transformacija spektara infracrvene spektroskopije) - uz primjenu totalne refleksije,) moguće je identificirati različite vrste piva na temelju sadržaja alkohola (Duarte i sur., 2004). Time su dobiveni podaci o fermentaciji piva kao bitnom procesu u njegovoj proizvodnji. Rodrigues i sur. (2010) identificirali su šest različitih korisnih organskih kiselina u pivu: octenu, limunsku, mliječnu, jabučnu, piruvinsku i jantarnu kiselinu. Organske kiseline imaju važnu ulogu u pivu. Osim što doprinose njegovom okusu, boji i aromi, dobar su indikator za utvrđivanje i kontrolu procesa fermentacije. PLS- NMR (Partial least square NMR, NMR metoda parcijalnih najmanjih kvadrata) metoda koristi se za kvantifikaciju organskih kiselina u pivu i daje nam informaciju o porijeklu i kvaliteti analiziranog piva (Rodrigues i sur., 2010).

2.3.3. Kava

Kava je popularno piće koje sadrži poznati stimulans kafein, psihoaktivnu supstancu konzumiranu svakodnevno diljem svijeta. Međutim, kava sadrži i druge tvari koje je u prehrambenoj industriji bitno i poželjno kontrolirati: mravlju kiselinu, trigonelin i 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF). Kafein i trigonelin povezuju se s gorčinom kave, mravlja kiselina utječe na razinu kiselosti kave, a 5-HMF služi kao indikator razine narušavanja

kvalitete kave tokom prženja.

Prisutnost mravlje kiseline, trigonelina, kafeina i 5-HMF u kavi moguće je odrediti pomoću NMR-spektroskopije (slika 11), iz čega se može zaključiti koliko je analizirana kava kvalitetna. Jedna od brojnih NMR-analiza kave pokazala je da ispitivana Baqué kava sadrži 4,2% kafeina, 2,6% mravlje kiseline, 2,4% trigonelina i 7,3% 5-HMF-a (del Campo i sur., 2010).

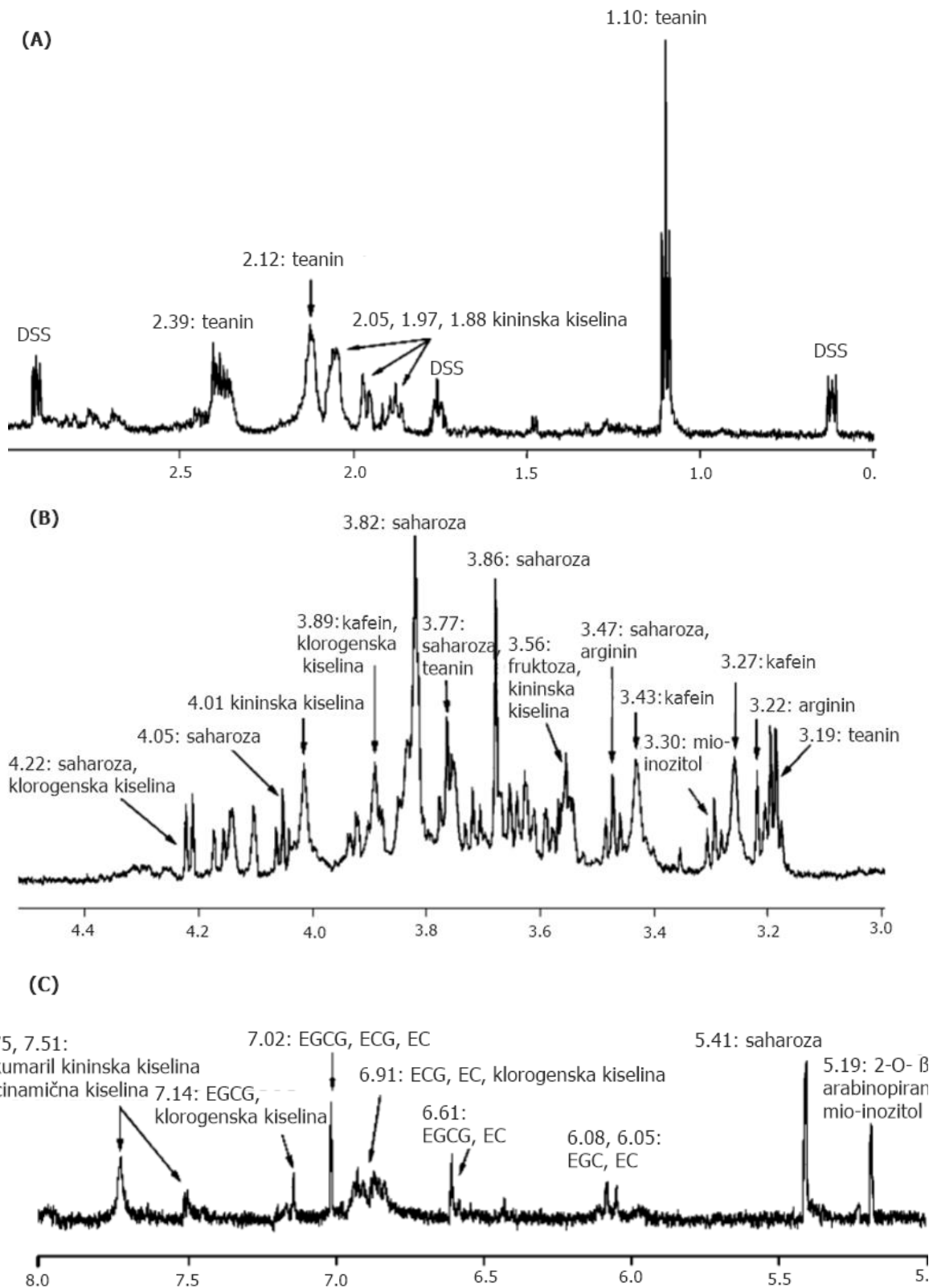


Slika 11. ¹H-NMR spektar uzorka Baqué kave (del Campo i sur., 2010).

2.3.4. Zeleni čaj

S obzirom da NMR omogućuje brzu identifikaciju i kvantifikaciju sastojaka hrane uz prethodnu jednostavnu pripremu uzoraka, smatra se izuzetno pogodnom metodom za analizu različitih vrsta namirnica. Analizu kvalitete zelenog čaja često određuju stručnjaci obučeni za provođenje senzorske analize. Ovakve analize sklone su odstupanjima zbog utjecaja subjektivnog doživljaja ispitivača. Pomoću ¹H NMR moguće je odrediti profil kemijskog sastava zelenih čajeva. ¹H NMR-analizom japanskog zelenog čaja visoke kvalitete utvrđena je prisutnost sljedećih organskih spojeva: teanin (1,10, 2,12, 2,39 i 3,19 ppm), kvininska kiselina (1,88, 1,97 i 2,05 ppm), kafein (3,27, 3,43 i 3,89 ppm), arginin (3,22 i 3,47 ppm), mioinozitol (3,30 ppm), klorogenska kiselina (3,89 i 4,22 ppm) te kvininska kiselina (3,56 i 4,01 ppm). Nakon oduzimanja signalâ saharoze i fruktoze, signal 2-*O*-β-L-arabinopiranozil-mioinozitola pojavljuje se pri 5,19 ppm, *p*-kumaril-kvininske kiseline i/ili cinamične kiseline pri 7,51 i 7,75 ppm, EGCG (epigalokatehin-galat) pri 6,61, 7,02 i 7,14 ppm te ECG (epikatehin-galat) pri 6,91

i 7,02 ppm (slika 12). Sve ove molekule bitne su u određivanju kvalitete zelenog čaja (Tarachiwin i sur., 2007).



Slika 12. $^1\text{H-NMR}$ spektri (750 MHz, D_2O , 25 °C) ekstrakta japanskog zelenog čaja mjereni pri (A) visokim, (B) srednjim i (C) niskim frekvencijama (Tarachiwin i sur., 2007).

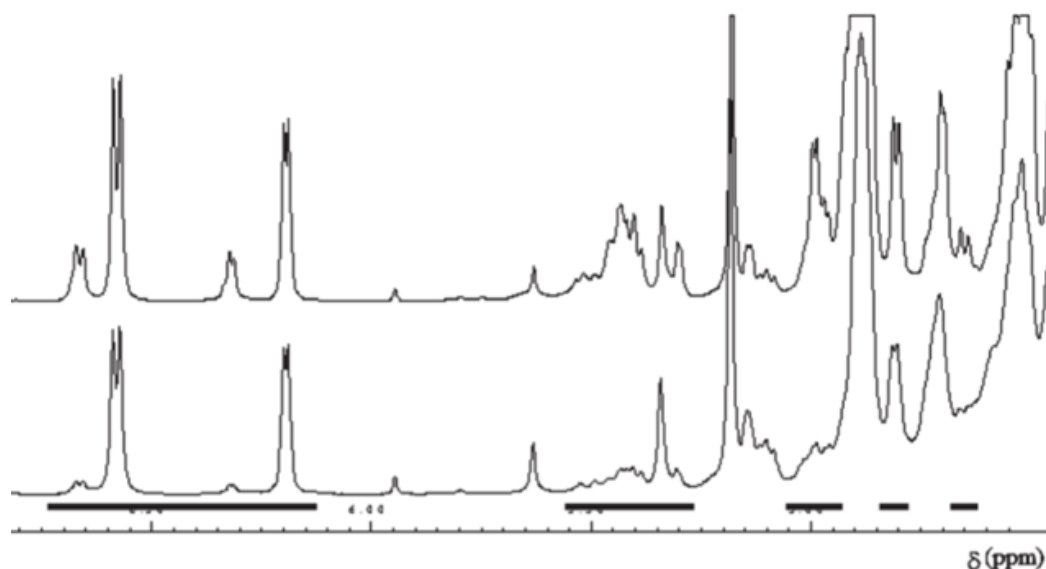
2.4. Kontrola autentičnosti namirnica

Pod patvorenjem namirnica podrazumijeva se svako namjerno mijenjanje sastava namirnice dodavanjem tvari koje inače prirodno ne sadrži, a koje služe kao zamjena za druge, vrijednije sastojke. Patvorenje je izvor nezakonite zarade. Dodani sastojak niske je kvalitete i može negativno utjecati na zdravlje čovjeka. Često se dodaje kako bi se povećala masa proizvoda ili kako bi on izgledao vrijednije i kvalitetnije nego što jest. Patvoriti se može gotove sve, a namirnice koje su pod povećanim rizikom su: mlijeko koje se često razrjeđuje, vino, pivo, začini u koje se dodaju imitacije, tijesta u koja se dodaju bojila umjesto jaja, med u koji se dodaje šećerni sirup te maslinovo koje se često miješa s drugim uljima. Patvorenje je zakonski kažnjivo, ali nažalost nije rijetkost (Bansal i sur., 2015).

Razvijanje instrumentacije za NMR-spektroskopiju koja je cjenovno povoljnija i time dostupnija nužno je kako bi se regulatornim jedinicama omogućilo korištenje ove metode za analizu i provjeru autentičnosti hrane. Prednost ove metode pred ostalima je to što analizirani uzorak ostaje sačuvan i nepromijenjen nakon analize. Ukoliko se pokaže da je određena namirnica patvorena, imati originalan uzorak velika je prednost ukoliko dođe do sudskog procesa.

2.4.1. Med

Posljednjih godina proizvodnja meda je pala, a time je porasla njegova cijena. Zato se povećala i incidencija patvorenja meda šećernim sirupima. Lolli i sur. (2008) proveli su istraživanje korištenjem 2D HR-NMR pomoću kojeg je moguće ustanoviti podrijetlo meda ukoliko je dobiven od samo jedne vrste cvjetova. Metoda se pokazala uspješnom. Kasnije se 1D NMR analiza pokazala efikasnijom, jednostavnijom i bržom metodom od 2D HR-NMR u detekciji patvorenja bez potrebe prethodne pripreme uzorka. Dobiveni rezultati slični su onima dobivenim pomoću FT-IR (92,5% podudarnost). Promjena u sastavu meda vidljiva je kao promjena određenih regija dobivenog spektra (slika 13) (Bertelli i sur., 2010). U drugom istraživanju uspješno je identificirano botaničko podrijetlo meda sa 100%-tnom točnošću koristeći $^1\text{H-NMR}$ (Schievano i sur., 2010).



Slika 13. Usporedba spektroskopskih regija dobivenih ^1H -NMR-spektrometrijom iz autentičnog (donji spektar) i patvorenog (gornji spektar) meda. Razlika je vidljiva u podcrtanim regijama (Bertelli i sur., 2010)

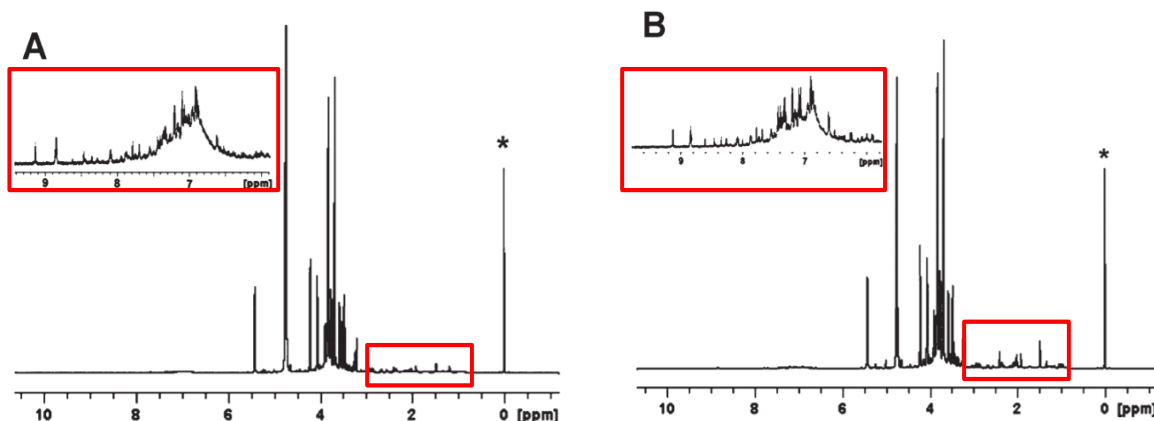
2.4.2. Maslinovo ulje

Kvaliteta djevičanskog maslinovog ulja povezana je s njegovim mjestom podrijetla te načinom prerade. Europska unija (EU) ima jako stroga pravila koja se tiču deklariranja maslinovog ulja, njegovog podrijetla i načina prerade. Budući da je djevičansko maslinovo ulje skupo, često se obilježava krivim deklaracijama ili se patvori. Iako se za određivanje kvalitete djevičanskog maslinovog ulja koriste i druge metode, NMR-spektroskopija pokazala se vrlo efikasnom u određivanju podrijetla maslinovog ulja. U svrhu autentifikacije korišteni su ^1H , ^{13}C i/ili ^{31}P -NMR pomoću kojih su se određivale vrijednosti neosapunjivih sastojaka djevičanskog maslinovog ulja i udio fenolnih spojeva u polarnim frakcijama (Alonso-Sacles i sur., 2010). Patvorenje je moguće otkriti i analizom masnih kiselina koje ulje sadrži. Takvom analizom moguće je otkriti prisutnost drugih dodanih ulja u maslinovom ulju prema sadržaju masnih kiselina (slika 6).

2.5. Identifikacija GM proizvoda

Pomoću NMR-spektroskopije moguće je razlikovati genetski modificirano (GM) povrće od onoga koje nije genetski modificirano. Analizom ekstrakta GM i nemodificiranog kukuruza

uočene su razlike u jačini i pojavnosti signala određenih sastojaka topljivih u vodi među kojima se najviše ističu etanol (1,18 ppm), mliječna kiselina (1,33 ppm), limunska kiselina (2,54 ppm), lizin (3,01, 1,69, 1,45, 1,89, 3,74 ppm), arginin (1,65, 1,72, 1,92, 3,23 ppm), glicin-betain (3,27, 3,91 ppm), (*R*)-galaktoza (5,00 ppm) i adenin (8,27 ppm) (slika 14). Ovom metodom moguća je i detekcija novonastalih metabolita koji nisu prisutni u izvornoj namirnici (Piccioni i sur., 2009).

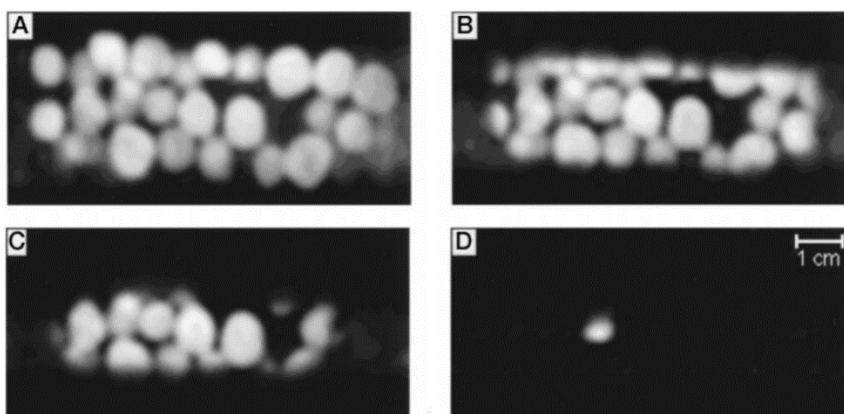


Slika 11. $^1\text{H-NMR}$ spektar (600,13 MHz, 26,85 °C) vodenog ekstrakta (A) genetski modificiranog i (B) ne-modificiranog kukuruza. Razlika u jačini signala i količini organskih spojeva istaknuta je crvenim pravokutnikom (Piccioni i sur., 2009).

2.6. Kontrola metoda konzerviranja

Zamrzavanje je jako bitan način očuvanja namirnica u prehrambenoj industriji. Njime se štite namirnice od kvarenja, a služi i očuvanju nutritivnih vrijednosti hrane. Mogućnost određivanja vremena potrebnog za zaleđivanje i obrasca po kojem nastaje bitni su faktori u kontroli kvalitete namirnica podvrgnutih zaleđivanju. Koristeći MRI možemo pratiti ponašanje

molekula tokom procesa zaleđivanja u raznim vrstama hrane. Tvorba leda djeluje tako da se gubi signal vode u NMR spektru, a vrijeme potrebno za gubitak signala jednako je vremenu potrebnom za zaleđivanje (slika 15) (Kerr i sur., 1998).



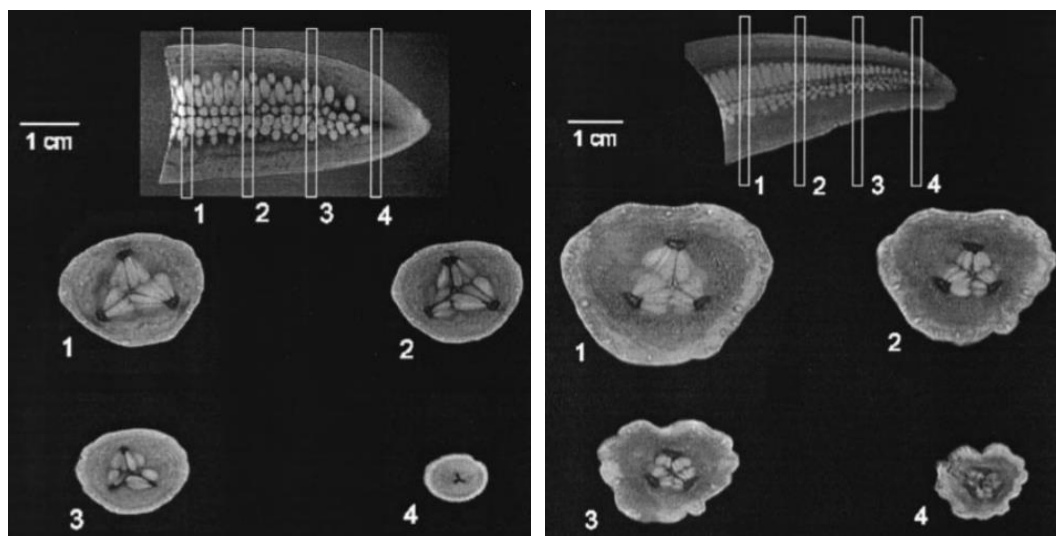
Slika 12. Gubitak signala vode zamrzavanjem graška pri -29 °C snimljeno pomoću MRI. A= 0 min, B= 12 min, C=24 min, D= 36 min (Kerr i sur., 1998).

Soljenje ribe koristi se već stoljećima kao način konzerviranja. Soljenjem bakalara utječe se na distribuciju vode u mišićnom tkivu bakalara, kao i na denaturaciju određenih proteina. Praćenjem promjena u koncentraciji i distribuciji vode pokazalo se da soljenje i rehidratacija bakalara čine ireverzibilnu promjenu u sastavu njegovih mišićnih stanica (Gudjónsdóttir i sur., 2010).

2.7. Kontrola mikrobiološke kontaminacije

NMR/MRI korišteni su u brojnim istraživanjima kao metode određivanja mikrobiološke, kemijske i fizikalne kvalitete sastojaka u različitim vrstama hrane (Gostan i sur., 2004; Gudjónsdóttir i sur., 2011; Pykett, 2000; Zehl i sur., 2011).

MRI se intenzivno koristi u svrhu kontrole voća i povrća od mikrobioloških kontaminacija (Pykett, 2000), a koristi se i za kontrolu mesa (Gudjónsdóttir i sur., 2011). Inače, kontrola mikrobiološke kvalitete hrane provodi se na reprezentativnim uzorcima. Na taj način nije ispitana cijela šarža proizvoda i uvijek će postojati mogućnost kontaminacije u neispitanim područjima namirnica ili proizvoda zbog različite distribucije mikroorganizma u proizvodu. Pomoću MRI možemo dobiti kompletnu sliku proizvoda i njegovog mikrobiološkog sadržaja. MRI metodom uspješno je i brzo uočena razlika između zdravih krastavaca i onih zaraženih gljivicama (*Mycosphaerella sp.*) (slika 16) (Hall i sur., 1998).

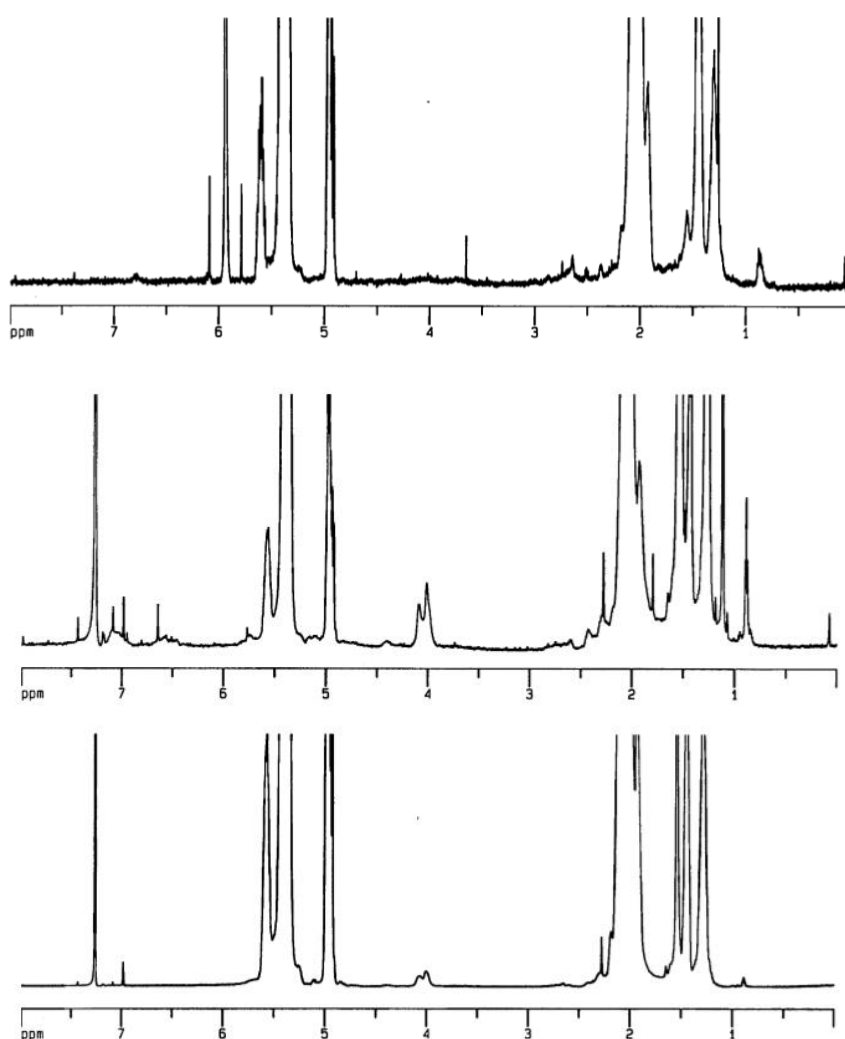


Slika 13. Presjek zdravog krastavca (lijevo) i krastavca zaraženog gljivicama *Mycosphaerella sp.* (desno). Snimljeno primjenom MRI (Hall i sur., 1998).

2.8. Kontrola ambalaže

Kvaliteta hrane direktno je povezana sa svojstvima ambalaže u koju se pakira. Optimizacija procesa pakiranja i pravilan odabir ambalaže omogućuju nam bolje održavanje, skladištenje i rukovanje hranom. NMR-spektroskopijom možemo analizirati ambalažu proizvoda i prema dobivenim rezultatima odabrati najidealniji sastav ambalaže.

U jednom istraživanju pomoću NMR zabilježen je utjecaj gama-zračenja (u rasponu od 1-100 kGy) na polimere koji tvore ambalažu (polistiren, poli-butadien, stiren-akrilonitril, polistiren visokog utjecaja i akrilonitril-butandiene-stiren) (slika 17) (Pentimalli i sur., 2000). U ovom slučaju polistiren se pokazao kao optimalan izbor zbog toga što je najmanje reagirao na utjecaj zračenja.



Slika 17. ^1H -NMR spektar (600,13 MHz): Promjena u strukturi poli-butadiena (PB) utjecajem gama-zračenja. Odozdo prema gore: neozračeni PB otopljen u CDCl_3 ($t = 26,85^\circ\text{C}$), topljiva frakcija ozračenog PB otopljenog u CDCl_3 ($D=100\text{ kGy}$, $26,85^\circ\text{C}$), netopljiva frakcija ozračenog PB otopljenog u $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ ($D=100\text{ kGy}$, $69,85^\circ\text{C}$) (Pentimalli i sur., 2000).

U drugoj studiji $^1\text{H-NMR}$ je korišten kako bi se pratila degradacija *Robiola* sira na zraku (nezapakiran) i u prozirnoj foliji kroz 7 dana na sobnoj temperaturi (15 °C). Spektar vodenih ekstrakata u nezapakiranom siru pokazao je veće varijacije u količini određenih sastojaka za razliku od onog koji je bio zapakiran (Lamanna i sur., 2008).

Ova istraživanja dokazuju da NMR-spektroskopija omogućava procjenu učinka određene ambalaže na kvalitetu hrane pri raznim vanjskim utjecajima i poželjna je metoda za analizu i zatim odabir vrste materijala od kojih će ambalaža biti izrađena (Marcon i sur., 2013).

3. ZAKLJUČAK

NMR-spektroskopija cijenjena je metoda u prehrambenoj industriji zahvaljujući visokoj preciznosti i točnosti rezultata kvalitativnih i kvantitativnih analiza. Nedestruktivnost i brzina dobivanja rezultata njene su velike prednosti pred ostalim analitičkim metodama. Primjena u analizi hrane je široka:

- Sadržaj vode, njen karakter i distribucija te veze koje tvori utječu na svojstva, kvarljivost i kvalitetu hrane. Pomoću MRI moguće je praćenje kretanja vode u namirnicama.
- Masne kiseline imaju različit utjecaj na zdravlje čovjeka te svojstva proizvoda kao što su mazivost, čvrstoća, okus i stabilnost. NMR omogućava razlikovanje i detekciju masnih kiselina prema duljini ugljikovodikovog lanca, broju nezasićenih veza i njihovim položajima u lancu.
- Određivanje aminokiselinskog profila hrane korištenjem NMR-spektroskopije bitno je zbog utvrđivanja sadržaja esencijalnih aminokiselina i alergena. Osim toga, proteini su reaktivne molekule koje mogu ulaziti u reakcije ili denaturirati s obzirom na različite pH-vrijednosti proizvoda, temperaturu te dodatak soli i ostalih sastojaka.
- Ugljikohidrati su velika skupina spojeva od kojih svaka ima različit utjecaj na zdravlje čovjeka, ali i svojstva proizvoda kao što su slatkoća, stabilnost, tekstura, viskoznost i posmeđivanje. Identifikacija ugljikohidrata moguća je primjenom NMR-spektrometrije.
- Patvorenje je česta praksa u prehrambenoj industriji, a pomoću NMR može se detektirati dodana, nepoželjna namirnica kao što su to šećerni sirupi u medu ili ostala ulja u djevičanskom maslinovom ulju.
- NMR-identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih sastojaka i tvari arome bitna je zbog njihove direktne povezanosti s aromom, kvalitetom i trajnosti proizvoda.
- Botaničko podrijetlo namirnice govori puno o njezinoj kvaliteti. Na primjer, NMR-određivanjem različitih kristala koje tvori škrob (A, B, C i V) moguće je otkriti njegovo botaničko podrijetlo te utjecaj na strukturu i svojstva namirnice.
- Genetičko procesiranje hrane sve je češće. Pomoću NMR moguće je prema strukturnoj analizi tvari topljivih u vodi (glukoza, fruktoza, etanol, limunska kiselina, trehaloza i glicin-betain) detektirati namirnice podvrgnute modificiranju.
- Primjena NMR-spektrometrije omogućuje optimizaciju koraka u procesiranju hrane i odabir idealne ambalaže praćenjem poželjnih i nepoželjnih promjena u strukturi hrane i ambalaže tokom prerade.

POPIS LITERATURE

- Adam-Berret M., Rondeau-Mouro C., Riaublanc A., Mariette F. (2008) Study of triacylglycerol polymorphs by nuclear magnetic resonance: Effects of temperature and chain length on relaxation parameters. *Magnetic Resonance in Chemistry* **46**: 550–557.
- Alonso-Salces R. M., Moreno-Rojas J. M., Holland M. V., Reniero F., Guillou C., Heberger K. (2010) Virgin olive oil authentication by multivariate analyses of ^1H NMR fingerprints and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$ data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 5586–5596.
- Bansal S., Singh A., Mangal M., Mangal A. K., & Kumar S. (2015) Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**: 1174–1189.
- Belton P. (2011) Spectroscopic Approaches to the Understanding of Water in Foods. *Food Reviews International* **27**: 170–191.
- Belton P. S., Delgadillo I., Holmes E., Nicholls A., Nicholson J. K., Spraul M. (1996) Use of high-field ^1H NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 1483–1487.
- Bertelli D., Lolli M., Papotti G., Bortolotti L., Serra G., Plessi M. (2010) Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 8495–8501.
- Brnjas-Kraljević J., Balarin M., Dolanski-Babić S. (1999) Principi oslikavanja magnetskom rezonancijom, *Medicinski vjesnik* **31**: 27-32
- Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**: 90-101.
- Butz P., Hofmann C., Tauscher B. (2005) Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *Journal of Food Science* **70**: 131–141.
- Chayaprasert W., Strohshine R. (2005) Rapid sensing of internal browning in whole apples using a low-cost, low-field proton magnetic resonance sensor. *Postharvest Biology and Technology* **36**: 291–301.
- Chen J.-H., Sambol E. B., Kennealey P. T., O'Connor R. B., DeCarolis P. L., Cory D. G., Singer S. (2004) Water suppression without signal loss in HR-MAS ^1H NMR of cells and tissues. *Journal of Magnetic Resonance* **171**: 143–150.
- Ciampa A., Dell'Abate M. T., Masetti O., Valentini M., Sequi P. (2010) Seasonal chemical–physical changes of PGI Pachino cherry tomatoes detected by magnetic resonance imaging (MRI). *Food Chemistry* **122**: 1253–1260.

- Consonni R., Cagliani L. R. (2008) Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ^1H NMR spectroscopy. *Talanta* **76**: 200–205.
- Consonni R., Cagliani L. R., Guantieri V., Simonato B. (2011) Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food Chemistry* **129**: 693–699.
- del Campo G. G., Berregi I. I., Caracena R. R., Zuriarrain J. J. (2010) Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by ^1H NMR spectrometry. *Talanta* **81**: 367–371.
- Duarte I., Barros A., Almeida C., Spraul M., Gil A.M. (2004) Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 1031–1038.
- Forouhi N. G., Krauss R. M., Taubes G., Willett W. (2018) Dietary fat and cardiometabolic health: evidence, controversies, and consensus for guidance. *BMJ (Clinical research ed.)* **361**: k2139.
- Gonera A., Cornillon P. (2002) Gelatinization of starch/gum/sugar systems studied by using DSC, NMR, and CSLM. *Starch-Starke* **54**: 508–516.
- Gostan T., Moreau C., Juteau A., Guichard E., Delsuc M. A. (2004) Measurement of aroma compound self-diffusion in food models by DOSY. *Magnetic Resonance in Chemistry* **42**: 496–499.
- Guillén M. a. D., Ruiz A. (2001) High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. *Trends in Food Science & Technology* **12**: 328–338.
- Gutowsky H. S., Kistiakowsky G. B., Pake G. E., Purcell E. M. (1949) Structural investigations by means of nuclear magnetism. 1. Rigid crystal lattices. *Journal of Chemical Physics* **17**: 972–981.
- Gudjonsdottir M., Gunnlaugsson V.N., Finnbogadottir G. A., Sveinsdottir K., Magnusson H., Arason S. (2010) Process control of lightly salted wild and farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by brine injection, brining, and freezing—A low field NMR study. *Journal of Food Science* **75**: E527–E536.
- Gudjónsdóttir M., Jónsson Á., Bergsson A.B., Arason S., Rustad T. (2011) Shrimp processing assessed by low field nuclear magnetic resonance, near infrared spectroscopy, and physicochemical measurements—The effect of polyphosphate content and length of prebrining on shrimp muscle. *Journal of Food Science* **76**: E357–E367.
- Hall L.D., Evans S.D., Nott K.P. (1998) Measurement of textural changes of food by MRI relaxometry. *Magnetic Resonance Imaging* **16**: 485–492.
- Herrero A. M., Cambero M. I., Ordonez J. A., Castejon D., Romero de Avila M. D., de la Hoz L. (2007) Magnetic resonance imaging, rheological properties, and physicochemical

characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 9357–9364.

- Hu F., Furihata K., Kato Y., Tanokura M. (2007) Nondestructive quantification of organic compounds in whole milk without pretreatment by two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 4307–4311.
- Hurrell RF, Finot PA. (1983) Food processing and storage as a determinant of protein and amino acid availability. *Experientia Suppl.* **44**: 135-56.
- Jaturasitha S., Srikanchai T., Kreuzer M., Wicke M. (2008) Differences in carcass and meat characteristics between chicken indigenous to northern Thailand (Black-boned and Thai native) and imported extensive breeds (Bresse and Rhode Island red). *Poultry Science* **87**: 160–169.
- Keeton J. T., Hafley B. S., Eddy S. M., Moser C.R., McManus B. J., Leffler T. P. (2003) Rapid determination of moisture and fat in meats by microwave and nuclear magnetic resonance analysis. *Journal of AOAC International* **86**: 1193–1202.
- Kerr W. L., Kauten R. J., McCarthy M. J., Reid D. S. (1998) Monitoring the formation of ice during food freezing by magnetic resonance imaging. *LWT — Food Science and Technology* **31**: 215–220.
- Lamanna R., Piscioneri I., Romanelli V., & Sharma N. (2008) A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ¹H-NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry* **46**: 828–831.
- Lolli M., Bertelli D., Plessi M., Sabatini A. G., Restani C. (2008) Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 1298–1304.
- Maljković D. (1992) *Spektrometrija, Tehnička enciklopedija, Leksikografski Zavod "Miroslav Krleža"*, Zagreb, 150-178.
- Marcon M.V., Carneiro P.I.B., Wosiacki G., Beleski-Carneiro E. (2005) Pectins from Apple Pomace – Characterization by ¹³C and ¹H NMR Spectroscopy. *Ann. Magn. Reson.* **4**: 56-63.
- Marccone M. F., Wang S., Albabish W., Nie S., Somnarain D., Hill A. (2013) Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International* **51**: 729–747.
- Matijević B. i Blažić M. (2008) Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka, *Mljekarstvo* **58** : 151-169.
- Merlin (2018) – L. Barišić (Nuklearna magnetska rezonancija). < <https://moodle.srce.hr/2018->

15.07.2019.

- Miyake Y., Yokomizo K., Matsuzaki N. (1998) Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**: 1091–1094.
- Pentimalli M., Capitani D., Ferrando A., Ferri D., Ragni P., Segre A. L. (2000) Gamma irradiation of food packaging materials: An NMR study. *Polymer* **41**: 2871–2881.
- Piccioni F., Capitani D., Zolla L., Mannina L. (2009) NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1Ab gene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 6041–6049.
- Pykett I. L. (2000) NMR — A powerful tool for industrial process control and quality assurance. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity* **10**: 721–723.
- Rochfort S., Ezernieks V., Bastian S. E. P., Downey M. O. (2010) Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry* **121**: 1296–1304.
- Rodrigues J. E., Erny G. L., Barros A. S., Esteves V. I., Brandao T., Ferreira A. A., Cabrita E., Gil A.M. (2010) Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta* **674** : 166–175.
- Schievano E., Peggion E., Mammi S. (2010) ¹H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 57.
- Schild HH. (1992) MRI made easy, Berlex Laboratories, str. 36-37., 80.
- Schmidt S. J., Sun X., Litchfield J. B., Eads T. M. (1996) Applications of magnetic resonance imaging in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**: 357–385.
- Sequi P., Dell'Abate M. T., Valentini M. (2007) Identification of cherry tomatoes growth origin by means of magnetic resonance imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 127–132.
- Shlomit D., Shani Levi C., Fahoum L., Ungar Y., Meyron-Holtz E. G., Shpigelman A., Lesmes U. (2018) Revisiting the carrageenan controversy: do we really understand the digestive fate and safety of carrageenan in our foods? *Food & Function* **9**: 1344–1352.
- Simpson A. J., Brown S. A. (2005) Purge NMR: Effective and easy solvent suppression. *Journal of Magnetic Resonance* **175**: 340–346.
- Šatalić Z., Sorić M., Mišigoj-Duraković M. (2016) Sportska prehrana, Znanje d.o.o., Zagreb, str. 147-156.

- Tarachiwin L., Ute K., Kobayashi A., Fukusaki E. (2007) ^1H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 9330–9336.
- Therien-Aubin H., Zhu X.X. (2009) NMR spectroscopy and imaging studies of pharmaceutical tablets made of starch. *Carbohydrate Polymers* **75**: 369–379.
- van Duynhoven J. P. M. (2017) Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 3. izd., Academic Press, str. 678–685.
- van de Velde F., Knutsen S. H., Usov A.I., Rollema H.S., Cerezo A.S. (2002) ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology* **13**: 73–92.
- Weekley A. J., Bruins P., Sisto M., Augustine M.P. (2003) Using NMR to study full intact wine bottles. *Journal of Magnetic Resonance* **161**: 91–98.
- Wolfe R. R., Baum J. I., Starck C., Moughan P. J. (2018) Factors contributing to the selection of dietary protein food sources. *Clinical Nutrition* **37**: 130–138.
- Zehl M., Braunberger C., Conrad J., Crnogorac M., Krasteva S., Vogler B. (2011) Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important Drosera species by LC-DAD, LC-NMR, NMR, and LC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**: 2565–2576.
- Zheng G., Stait-Gardner T., Anil Kumar P. G., Torres A. M., Price W. S. (2008) PGSTE-WATERGATE: An STE-based PGSE NMR sequence with excellent solvent suppression. *Journal of Magnetic Resonance* **191**: 159–163.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Maja Lastovčić
ime i prezime studenta