

Hemometrijski pristup razvoju kolorimetrijske metode za procenu količine prehrambenih boja u proizvodima od mesa

Radivoj B. Petronijević¹, Vesna F. Matekalo-Sverak¹, Aurelija T. Spirić¹, Ilija K. Vuković², Jelena A. Babić¹, Milan P. Milijašević¹, Dejana K. Trbović¹

¹Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

Izvod

Cilj ovog rada je bio da se, merenjem vrednosti parametara boje preseka proizvoda od mesa u CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*, Međunarodna komisija za osvetljenje) $L^*a^*b^*$ prostoru (L^* – svetloća, a^* – udeo crvene boje i b^* – udeo žute boje) ispita mogućnost procene sadržaja dodate prehrambene boje u proizvodima od mesa. Količina prehrambene boje u uzorcima od mesa određena je metodom visokoefikasne tečne hromatografije sa detekcijom na fotodiodnom sloju (HPLC-PDA), a međusobna zavisnost dobijenih vrednosti i kolorimetrijskih parametara ispitana je višestrukom linearnom regresijom (MLR). Kalibracioni set od 10 proizvodnih partija fino usitnjene barene kobasice, sa tri dodate boje, izrađen je u industrijskim uslovima, i to: kontrolni proizvod bez boje i 9 proizvoda sa različitim količinama dodatih boja E 120 (3,4; 7,5 i 12,5 mg/kg), E 124 (5, 15 i 25 mg/kg) i E 129 (5, 15 i 25 mg/kg). Postavljene su jednačine funkcije zavisnosti količine boje od L^* , a^* i b^* vrednosti. Dobijeni matematički modeli su provereni i primenjeni za procenjivanje sadržaja boje u 21 uzorku fino usitjenih barenih kobasica sa tržišta. Utvrđeno je da se kolorimetrijskom CIE $L^*a^*b^*$ metodom mogu, u toku senzorskog ocenjivanja boje proizvoda, proceniti količine dodatih boja u proizvodima od mesa i da se ova metoda može primeniti kao komplementarna HPLC-PDA.

Ključne reči: prehrambene boje, CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda, HPLC-PDA, višestruka linearna regresija (MLR).

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Izgled proizvoda od mesa je jedna od važnijih karakteristika za njegovu prihvatljivost od strane potrošača [1], a zavisi od upotrebljenih sirovina i tehnološkog postupka koji je primenjen u toku proizvodnje. Izgled proizvoda od mesa i njegova prihvatljivost se može poboljšati dodavanjem prehrambenih boja. Najčešće se koriste veštačke i prirodne, crvene, boje. Po propisima EU, ali i u skladu sa nacionalnom regulativom, u fino usitnjenim barenim kobasicama dozvoljena je upotreba boje E 120 (Košenila, karminska kiselina) [2], do količine od 100 mg/kg proizvoda. Veštačke boje čija upotreba je dozvoljena samo u nekim proizvodima od mesa [3] su azo-boje [4] Ponso 4R (E 124) i Alura crvena AC (E 129). Istraživanja koja su poslednjih decenija sprovedena [5,6] pokazuju da sintetičke boje mogu da imaju negativne zdravstvene posledice kod osetljivih osoba i dece. Postoji sumnja da E 120 i neke dozvoljene veštačke, crvene, boje (E 124 i E 129) mogu da izazovu pojavu hiperaktivnosti kod dece, kožna oboljenja kod osetljivih i respiratorne probleme kod astmatičnih osoba [7,8]. Ne postoje pouzdani dokazi da su ove boje, poje-

dinačno, izazivači navedenih zdravstvenih problema [9], ali postoji opravdana indicija da mogu nepovoljno da utiču kada su u smeši, ili kada su pomešane sa drugim prehrambenim bojama i aditivima [7,10].

Za određivanje količina prirodnih i veštačkih boja u hrani razvijen je veliki broj različitih analitičkih metoda, kao što su spektrofotometrijske [11,12], elektrohemijske [13,14] i razne hromatografske metode (tankoslojna hromatografija, TLC, visokoefikasna tečna hromatografija, HPLC i jonska hromatografija, IC) [15–18] i kapilarna elektroforeza (CE) [19]. Autori saopštavaju da je navedenim metodama moguće određivanje dozvoljenih, prirodnih i sintetičkih, crvenih boja u prehrambenim proizvodima, pojedinačno ili u smeši. Međutim, u najvećem broju slučajeva, navedene metode se odnose samo na određivanje sintetičkih boja u hrani.

CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*, Međunarodna komisija za osvetljenje) [20] $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda se, veoma često, uz senzorsko ocenjivanje, koristi za instrumentalno opisivanje boje proizvoda od mesa [21,22]. Metoda se zasniva na kolorimetrijskom kvantifikovanju vrednosti svetloće (L^*), udela crvene (a^*) i udela žute boje (b^*) površine predmeta na način koji je najbliži percepciji boje predmeta ljudskog oka. Pošto se za merenje koriste kolorimetri (hromometri), CIE $L^*a^*b^*$ merenja, za razliku od senzorskih ispitivanja, ne zavise od subjektivnosti ispi-

NAUČNI RAD

UDK 637.5.058:543.544.5:66

Hem. Ind. 68 (6) 781–791 (2014)

doi: 10.2298/HEMIND131204004P

Prepiska: R.B. Petronijević, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kaćanskog 13, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: rpetronijevic@inmesbgd.com

Rad primljen: 4. decembar, 2013

Rad prihvaćen: 22. januar, 2014

tivača. Metoda je brza, ne zahteva komplikovanu pripremu uzoraka i merenja se mogu izvesti i van laboratorije. CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda se, sama ili zajedno sa multivarijantnim statističkim metodama, koristi za kvantitativno određivanje i predikciju promena boje kod proizvoda od mesa nastalih usled promene njegove recepture, atmosfere u koju se proizvod pakuje, načina pakovanja, itd. [23–25], ali se retko koristi u analitičke svrhe, za predikciju količine određene supstance u proizvodu [26]. Iz tih razloga nije postojala mogućnost poređenja dobijenih rezultata sa literaturnim. Merenje boje po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu ne može direktno da se koristi za određivanje količine dodate boje, jer druge obojene materije koje su prisutne u proizvodu, kao što je začinska paprika, ali i kategorija i boja upotrebljenog mesa utiču na boju preseka proizvoda [27,28]. Pouzdanost merenja zavisi od homogenosti boje preseka proizvoda, tako da će merenje L^* , a^* i b^* parametara boje proizvoda koji su fino usitnjeni (fino usitnjene barene kobasice) biti pouzdanije i tačnije nego u proizvodima sa nehomogenom bojom preseka.

Hemometrijska kalibracija analitičkih metoda podrazumeva korišćenje različitih regresionih modela (više-struka linearna regresija, MLR, regresija analizom glavnih komponenti, PCA-R, regresija metodom parcijalnih najmanjih kvadrata, PLS-R i dr) za utvrđivanje zavisnosti između analitičkih rezultata. Izbor modela zavisi od broja ulaznih nezavisnih promenljivih veličina (prediktora) kao i od broja uzoraka u kalibracionom setu. MLR model je najpogodniji za primenu kada je broj ulaznih nezavisnih promenljivih manji od broja uzoraka u kalibracionom setu [29].

Osnovni cilj ovog ispitivanja je bio da se razvije CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda za brzu procenu količina prehrambenih boja u proizvodima od mesa, na osnovu matematičkih modela izvedenih primenom višestruke linearne regresije rezultata dobijenih CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskim i HPLC određivanjima. Drugi cilj je bio da se razvijena CIE $L^*a^*b^*$ metoda, posle kalibracije i provere na eksperimentalnim proizvodima, primeni za procenu količina boja u fino usitnjenim barenim kobasicama sa tržišta.

EKSPERIMENTALNI DEO

Reagensi

Standardne supstance (Karminska kiselina, E 120, Ponso 4R, E 124, i Alura crvena AC, E 129) nabavljene su od SIGMA-ALDRICH (Nemačka). Organski rastvarači, metanol i acetonitril, su bili HPLC čistoće, CHROMA-SOLV, Sigma (Nemačka). Voda koja je korišćena za izradu standardnih rastvora boja i puferskog rastvora bila je HPLC čistoće, JT Baker (SAD).

Amonijum-acetat i sirćetna kiselina, koji su korišćeni za pripremu rastvora pufera, bili su p.a. čistoće, MERCK (Nemačka). Puferski rastvor pH vrednosti 7,1 je pripremljen rastvaranjem 3,8541 g amonijum-acetata u 1000 ml vode HPLC čistoće.

Proizvodi od mesa

Za potrebe razvoja CIE $L^*a^*b^*$ metode multivarijantnom kalibracijom, kao i za proveru MLR modela, izrađeno je 10 proizvodnih partija fino usitnjenih barenih kobasica, prema recepturi za „parisku kobasicu“ (kalibracioni set). Za izradu kobasica korišćeno je svinjsko meso, juneće meso, emulzija kožica, sojino brašno, hidrirane sojine ljuspice, led, začini i aditivi. Sve proizvodne partije „pariske kobasice“ izrađene su u industrijskom pogonu, a svaka partija je, zbog različitih vrsta i količina boja, posebno pripremljena. Eksperimentalnom proizvodu su dodavane sledeće boje: E 120, E 124 i E 129. Vrste i količine boja koje su dodate eksperimentalnim kobasicama prikazane su u tabeli 1. Sintetičke boje (E 124 i E 129) su dodate u većim količinama (od 5 do 25 mg/kg) da bi se postigao sličan intenzitet boje kao sa dodatkom prirodnom bojom E 120, koja je dodata u količinama navedenim u tabeli 1.

Tabela 1. Dodate boje eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“
Table 1. Food colorants added to the experimental „Parisian sausage“

Proizvodna partija	Boja	Količina, mg/kg
1	–	0,00
2	E 120, Košenila	3,40
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

CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda, koja je razvijena na osnovu eksperimentalnih model proizvoda, je primenjena za procenu količina boja u 21 proizvodu koji su nabavljeni iz više prodajnih objekata, poreklom od nekoliko domaćih proizvođača i iz uvoza.

Senzorsko ocenjivanje proizvoda

Boja preseka eksperimentalnih proizvoda i proizvoda sa tržišta ocenjivana je kvantitativno-deskriptivnom analizom po Uputstvu metodologije za senzorske analize, SRPS ISO 6658/2001 [30]. Na skali intenziteta od 1 do 5 ocenjivana je boja preseka proizvoda od mesa. Ispitivanja je izvršilo šest obučanih ocenjivača. Za ocenu boje eksperimentalnih proizvoda je korišćena kvantitativno-deskriptivna skala sa sledećim ocenama:

1 – neprihvatljiva boja, 2 – boja na granici prihvatljivosti, 3 – prihvatljiva boja, 4 – veoma prihvatljiva boja i 5 – izuzetno prihvatljiva boja.

Priprema uzoraka za hromatografska ispitivanja

Za izolovanje boja iz proizvoda od mesa korišćena je ubrzana ekstrakcija rastvaračima, pri visokom pritisku i temperaturi (*Accelerated Solvent Extraction*, ASE), [18], na aparatu ASE 100 (Dionex, SAD). Masa uzorka za ispitivanje iznosila je 1 g. Boje iz proizvoda od mesa su ekstrahovane pomoću metanola na temperaturi od 70 °C, u 4 ekstrakciona ciklusa od po 12 min. Ekstrakti su spojeni i potom, na rotacionom vakuum uparivaču, upareni do suva. Suvi ostatak je rastvoren u 2 ml 1:1 zapreminske smeše acetonitrila i amonijum-acetata, 50 mmol/dm³. Ukupno vreme potrebno za ekstrakciju uzorka je oko 1 h.

HPLC-PDA hromatografija

Količina boje u ispitanim proizvodima od mesa je određena visokoefikasnom tečnom hromatografijom. Sistem za hromatografiju se sastojao od tečnog hromatografa sa autosemplerom Alliance 2695 Separations Module (Waters, SAD), sa detektorom sa fotodiodnim slojem 2996 Photodiode Array Detector (Waters, SAD). Hromatografsko razdvajanje boja je postignuto na Phenomenex Kinetex reverzno-faznoj C18 koloni, dimenzija 150×4,60 mm i veličina čestica 2,6 μm. Mobilna faza se sastojala od rastvora 50 mmol/dm³ amonijum-acetata pH vrednosti 7,1 (A) i acetonitrila (B). Pri hromatografskom određivanju udeo A u mobilnoj fazi je postepeno opadao od 100 do 40% u toku 12 min od injektovanja dok je istovremeno udeo B rastao od 0 do 60%, a potom je sastav mobilne faze naglo vraćen na početne vrednosti (gradijent mobilne faze). Boje su identifikovane na osnovu njihovih retencionih vremena iz hromatograma izvedenih iz trodimenzionalnih podataka koji su dobijeni detekcijom na fotodiodnom sloju. Potvrda prisustva boja je izvršena na osnovu UV spektra izvedenih iz istih podataka. Radni opseg metode je od 1–100 mg/kg boje u uzorku. Vreme potrebno za akviziciju hromatograma uzorka iznosilo je 15 min. Određivanje vrste i sadržaja boja u eksperimentalnim proizvodima, visokoefikasnom tečnom hromatografijom, je rađeno u 6 ponavljanja. Izračunate su standardne devijacije određivanja, koeficijenti varijacije i povratni prinos (recovery).

Određivanje boje (CIE $L^*a^*b^*$) kolorimetrijskom metodom

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. (Japan). Proizvodi su snimani, posle kalibracije uređaja, pri sledećim uslovima: prečnik otvora objektiva 8 mm, standardno CIE D65 difuzno osvetljenje, izvor sve-

tlosti – pulsna ksenonska lampa, ugao vidljivosti 0 stepeni. Vrednosti su merene na poprečnim presecima, odmah posle narezivanja. Proizvodi su narezivani poprečno u odnosu na uzdužnu osu, na rastojanju od 1–2 cm, tako da se dobije šest paralelnih preseka proizvoda.

Statistička obrada podataka

Deskriptivna statistika je primenjena za obradu dobijenih rezultata, koji su prikazani u tabelama u obliku "srednja vrednost±standardna devijacija" (SD). Statističke značajnosti rezultata su utvrđene *t*-testovima i analizom varijanse (ANOVA). Matematički modeli su dobijeni višestrukom linearnom regresijom (MLR) rezultata CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskih ispitivanja i HPLC određivanja količina boja dodatih eksperimentalnim proizvodima.

Višestruka linearna regresija (*Multiple Linear Regression*, MLR) je data opštom jednačinom oblika:

$$Y_i = \alpha + \beta_1 X_{i,1} + \dots + \beta_n X_{i,n} + \varepsilon_i \quad (1)$$

gde su Y_i – zavisno promenljiva veličina, $X_{i,j}$ – nezavisno promenljiva veličina, j – broj nezavisno promenljivih, a i – broj merenja, α – odsečak prave, β – koeficijenti, a ε_i – greška merenja. Kraće se jednačina (1) može napisati:

$$Y_i = E(Y|X_i) + \varepsilon_i \quad (2)$$

gde je $E(Y|X_i)$ funkcija eksperimentalno određene zavisno promenljive Y za i merenja nezavisno promenljive X .

Za statističku obradu rezultata i izračunavanja su korišćeni softverski paketi MS Office Excel i JMP 10 Statistical Discovery (SAS Institute, SAD).

REZULTATI

Senzorsko ocenjivanje eksperimentalnih proizvoda od mesa

Senzorske ocene boje eksperimentalne „pariske kobasice“ su prikazane u tabeli 2. Na osnovu prikazanih rezultata može da se konstatuje da je boja preseka kontrolnog proizvoda, eksperimentalne barene kobasice bez dodate boje, ocenjena kao prihvatljiva (3,00). Najviše ocene su dobile proizvodne partije 2, 6 i 9 (4,50; 4,42 i 4,40, redom).

Srednje vrednosti senzorskih ocena boje eksperimentalne „pariske kobasice“ statistički su upoređene analizom varijanse i Taki-Kramer testom [31] poređenja srednjih vrednosti. Proizvodne partije „pariske kobasice“ 2, 6 i 9 su najprihvatljivije u pogledu boje preseka. Njihove ocene su bile između 4,00 i 4,50. Najprihvatljiviju boju preseka je imala „pariska kobasica“ sa najmanjim sadržajem E 120 (3,4 mg/kg, proizvodna partija 2), a zatim „pariska kobasica“ sa sadržajem E 124 (proizvodna partija 6) i E 129 (proizvodna partija 9), u količini od 15 mg/kg. Za prihvatljivost boje preseka, senzorne ocene „pariske kobasice“ proizvod-

Tabela 2. Senzorske ocene boje eksperimentalne „pariske kobasice“

Table 2. Sensory evaluation of the color of experimental „Parisian sausage“

Proizvodna partija	Boja	Prihvatljivost boje preseka
1	–	3,00±0,32
2	E120	4,50±0,45 ^a
3	E120	3,83±0,26 ^b
4	E120	2,77±0,41 ^c
5	E124	3,67±0,41 ^b
6	E124	4,42±0,20 ^a
7	E124	3,80±0,45 ^b
8	E129	3,50±0,45 ^b
9	E129	4,40±0,32 ^a
10	E129	3,50±0,32 ^b

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

CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska ispitivanja

Rezultati merenja boje eksperimentalne „pariske kobasice“ prikazani su u tabeli 3. Srednje L^* , a^* i b^* vrednosti eksperimentalnog proizvoda bez dodate boje su bile 73,07, 11,04 i 13,89, redom.

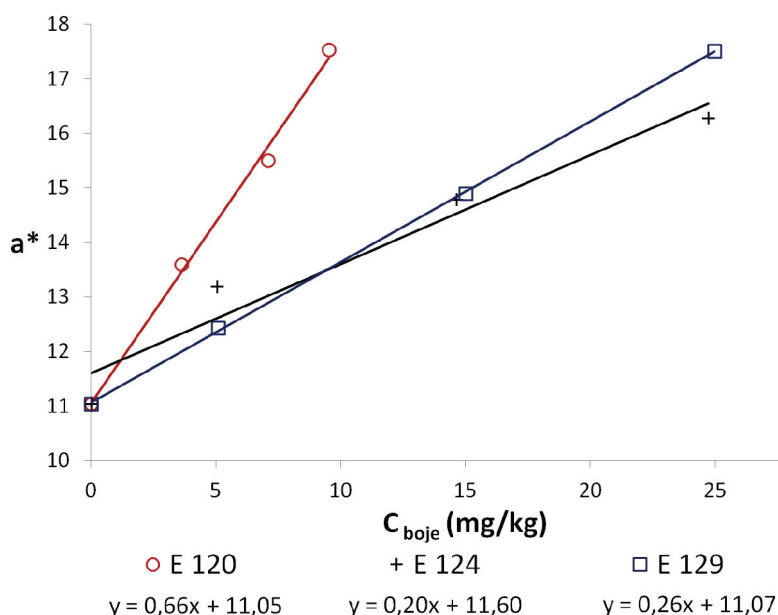
Za proizvode kojima su dodate boje vrednosti L^* su bile manje nego kod kontrolnog proizvoda (od 69,52 do 70,81 za proizvod sa bojom E 120, od 70,14 do 71,33 za proizvod sa bojom E 124 i od 69,78 do 72,14 za proiz-

vod sa bojom E 129). Vrednosti a^* eksperimentalne „pariske kobasice“ sa dodatom bojom su bile veće u odnosu na vrednosti istog parametra kontrolnog proizvoda (od 13,60 do 17,53 za proizvodne partije sa bojom E 120, od 13,19 do 16,27 za proizvode sa bojom E 124 i od 12,43 do 17,50 za proizvod sa dodatom bojom E 129). Vrednosti b^* eksperimentalnih proizvodnih partija sa bojom E 120 su bile manje nego kod kontrolnog proizvoda (od 11,66 do 13,49), dok su vrednosti b^* proizvodnih partija sa bojama E 124 i E 129 bile veće (od 14,26 do 14,55 i od 14,15 do 14,56 redom).

Tabela 3. $L^*a^*b^*$ vrednosti boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“Table 3. $L^*a^*b^*$ values of the cross-section color of experimental „Parisian sausage“

Proizvodna partija	L^*	a^*	b^*
1	73,07±0,34	11,04±0,23	13,89±0,18
2	70,81±0,48 ^a	13,60±0,27 ^c	13,49±0,23 ^a
3	70,80±0,39 ^a	15,50±0,27 ^b	12,96±0,25 ^b
4	69,52±0,32 ^b	17,53±0,26 ^a	11,66±0,17 ^c
5	71,33±0,41 ^a	13,19±0,99 ^c	14,26±0,24 ^a
6	70,82±0,43 ^a	14,78±0,92 ^b	14,29±0,43 ^a
7	70,14±0,09 ^b	16,27±0,15 ^a	14,55±0,11 ^a
8	72,14±0,26 ^a	12,43±0,17 ^c	14,15±0,40 ^a
9	70,90±0,21 ^b	14,90±0,22 ^b	14,36±0,45 ^a
10	69,78±0,20 ^c	17,50±0,20 ^a	14,56±0,51 ^a

Zavisnost vrednosti a^* , koja predstavlja udeo crvene boje u CIE $L^*a^*b^*$ sistemu, od količine dodate boje u eksperimentalnim barenim kobasicama je prikazana na slici 1.

Slika 1. Zavisnost a^* vrednosti od količine dodate boje u eksperimentalnim barenim kobasicama.Figure 1. Correlation of a^* value and added food colorant in experimental cooked sausages.

HPLC ispitivanja

Rezultati određivanja boje tečnom hromatografijom u eksperimentalnim proizvodima su prikazani u tabeli 4.

Vrednosti za povratne prinose kod određivanja boje E 120 u „pariskoj kobasici“ su bile u opsegu od 76,15 do 107,04%, kod određivanja boje E 124 bile su u opsegu od 97,61 do 101,03%, a kod određivanja boje E 129 bile su u opsegu od 99,91 do 101,67%. Standardne devijacije određivanja količina boja u „pariskoj kobasici“ bile su u intervalu od 0,04 do 0,23 mg/kg, za E 120, od 0,31 do 0,54 mg/kg, za E 124 i od 0,18 do 0,26 mg/kg, za E 129.

Višestruka linearna regresija

Za kalibraciju rezultata merenja boje preseka eksperimentalnih proizvoda po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu i tečno-hromatografskog određivanja sadržaja boje korišćena je višestruka linearna regresija [29]. Za obradu su upotrebljene vrednosti L^* , a^* i b^* eksperimentalnih proizvoda (nezavisne promenljive, X) i hromatografskog određivanja (zavisna promenljiva, Y). Svaki kalibracioni set za E120, E124 i E129 činile su po tri proizvodne partije sa različitim količinama boje i jedna proizvodna partija bez boje (kontrola). Ispitivanja su urađena u šest ponavljanja, što ukupno predstavlja 24 određivanja po jednom kalibracionom setu. Rezultati višestruke linearne regresije su prikazani u tabeli 5. Na osnovu prikazanih rezultata može se konstatovati da su vrednosti koeficijenata determinacije (R^2) linearnih modela kod „pariske kobasice“ 0,954, za E 124, 0,987, za E 120 i 0,993, za E129, a vrednosti korena srednjeg kvadrata greške modela (*Root Mean Square Error*, *RMSE*) 0,445, 2,228 i 0,881, redom.

Korišćenjem jednačine (1) dobijeni su matematički modeli – regresione jednačine procene sadržaja boja u fino usitnjenim barenim kobasicama:

$$Y_{E120} = 0,39L^* + 1,77a^* + 0,28b^* - 51,78 \quad (3)$$

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

$$Y_{E129} = -1,19L^* + 3,23a^* + 0,51b^* + 43,92 \quad (5)$$

gde su Y koncentracije ispitanih boja u proizvodu, izražene u mg/kg.

Tabela 5. Koeficijenti determinacije i statistička značajnost parametara dobijenih pomoću MLR; R^2 – koeficijent determinacije, *RMSE* – koren srednjeg kvadrata greške modela, *Prob>|t|* – vrednost verovatnoće kao mera statističke značajnosti

Table 5. Coefficients of determination and statistical significance of parameters obtained by MLR

Parametar	E 120	E 124	E 129
R^2	0,987	0,954	0,993
<i>RMSE</i>	0,445	2,228	0,881
Broj određivanja	24	24	24
Odsečak	51,78	28,25	43,92
Koeficijenti			
L^*	0,39	0,0095	-1,19
a^*	1,77	4,90	3,23
b^*	0,28	-1,99	0,51
Prob> t			
L^*	0,0491*	0,9930*	0,0702*
a^*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
b^*	0,3148*	0,2980*	0,4894*

Rezultati za količine boja u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“ koji su dobijeni hromatografskim određivanjem i odgovarajuće vrednosti koje su izračunate na osnovu jednačina (3)–(5) prikazani su u tabeli 6.

Zamenom L^* , a^* i b^* vrednosti, koje su izmerene za svaki proizvod, u odgovarajućim jednačinama, izračunate su količine boja u tim proizvodima i poređene su sa rezultatima HPLC ispitivanja. Za poređenje je korišćen dvosmerni *t*-test. Za E 120 i E 129 nije bilo značajnih odstupanja između hromatografski određene količine boje u eksperimentalnim proizvodima i količine boje koja je izračunata matematičkim modelom. U slučaju E 124, postojala je statistički značajna razlika

Tabela 4. Rezultati HPLC-PDA određivanja dodatih boja u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“

Table 4. HPLC-PDA data for the added food colorants to experimental “Parisian sausage”

Proizvodna partija	Boja	Količina dodate boje mg/kg	Određena količina mg/kg	Standardna devijacija mg/kg	Koeficijent varijacije %	Povratni prinos, %
1	–	–	–	–	–	–
2	E120	3,4	3,63	0,22	6,15	107,04
3	E120	7,5	7,10	0,04	0,51	94,62
4	E120	12,5	9,52	0,23	2,37	76,15
5	E124	5	5,05	0,54	10,75	101,03
6	E124	15	14,64	0,31	2,13	97,61
7	E124	25	24,74	0,41	1,68	98,95
8	E129	5	5,08	0,21	4,11	101,67
9	E129	15	15,01	0,18	1,17	100,04
10	E129	25	24,98	0,26	1,03	99,91

Tabela 6. Količine boja određene HPLC i CIE $L^*a^*b^*$ metodama u eksperimentalnim barenim kobasicama
 Table 6. Quantities of food colorants determined by HPLC and CIE $L^*a^*b^*$ methods in experimental cooked sausages

Proizvodna partija	Boja	HPLC određivanje, mg/kg	Izračunato po modelu, mg/kg	Prob> t
1	–	–	0,11±0,51	0,634
2	E120	3,63±0,22	3,65±0,42	0,897
3	E 120	7,10±0,04	6,88±0,38	0,204
4	E 120	9,52±0,23	9,61±0,34	0,572
5	E 124	5,05±0,54	6,89±1,85	0,059
6	E 124	14,64±0,31	15,41±2,52	0,493
7	E 124	24,74±0,41	23,24±0,67	0,002*
8	E 129	5,08±0,21	5,66±0,77	0,131
9	E 129	15,01±0,18	14,62±1,24	0,487
10	E 129	24,98±0,26	24,99±0,33	0,955

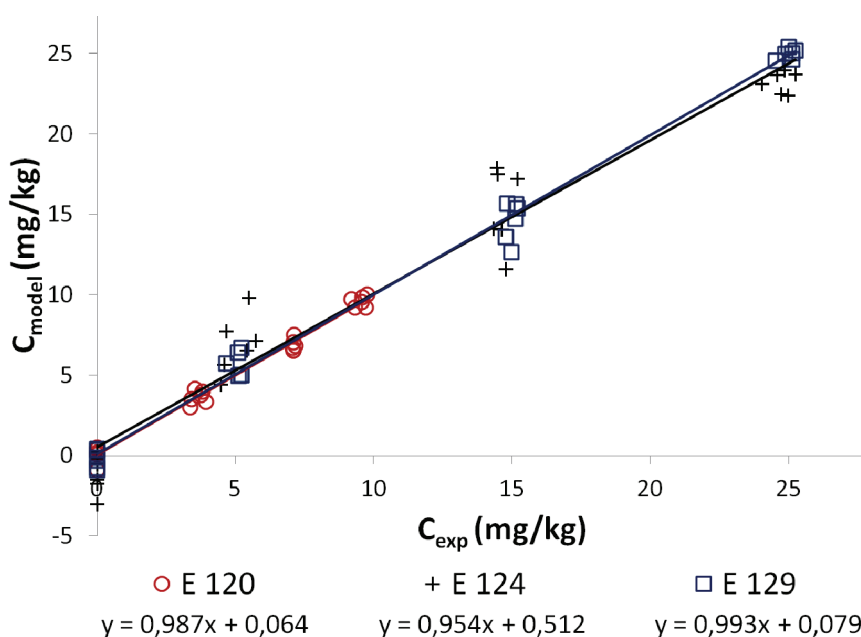
između vrednosti eksperimentalno određenih količina i količina izračunatih po matematičkom modelu za količinu boje od 25 mg/kg. Grafički prikaz međusobnih odnosa rezultata dobijenih na osnovu HPLC ispitivanja i modela zasnovanog na CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskoj metodi dat je na slici 2.

Proizvodi sa tržišta

Metoda tečne hromatografije za određivanje boja i CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda su primenjene za ispitivanje fino usitnjenih barenih kobasica sa domaćeg tržišta. Ispitan je ukupno 21 proizvod fino usitnjenih barenih kobasica. Od toga, 18 uzoraka (85,71%) su proizvodi domaćih proizvođača, a tri (14,29%) su proizvodi iz uvoza. Senzorskim ispitivanjem je ocenjena boja preseka proizvoda, CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskom metodom su određeni parametri boje, a tačnom hromato-

grafijom je određena vrsta i količina dodate boje u proizvode. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 7. Za 12 (57,14%), od ukupnog broja ispitanih proizvoda, prihvatljivost boje preseka je ocenjena ocenom manjom od 3,50. Od tih proizvoda, četiri (33,33%) je imalo slabo izraženu boju preseka, a 8 (66,67%) suviše intenzivnu boju. Od ukupno 21 ispitanih proizvoda, u 20 (95,24%), utvrđeno je prisustvo boje, a samo u jednom proizvodu (4,76%) nije ustanovljeno prisustvo boje. Od proizvoda u kojima je dokazana boja, u 16 proizvoda (80,00%) je ustanovljena boja E 120, a u četiri (20,00%) boja E 129. Prisustvo boje E 124 nije ustanovljeno ni u jednom od ispitanih proizvoda.

Na rezultate merenja prisustva dodatih boja u proizvodima sa tržišta primenjeni su matematički modeli dobijenim višestrukom linearnom regresijom (jednačine (3) i (5)). Izračunate vrednosti za količine boja u pro-



Slika 2. Provera $L^*a^*b^*$ modela kod određivanja sadržaja boja u eksperimentalnim barenim kobasicama.
 Figure 2. Evaluation of $L^*a^*b^*$ model in determination of food colorants in experimental sausages.

Tabela 7. Senzorske ocene, rezultati CIE $L^*a^*b^*$ i HPLC ispitivanja uzoraka sa tržišta
 Table 7. Sensory evaluation, CIE $L^*a^*b^*$ and HPLC data for the samples from retail

R. br.	Senzorska prihvatljivost boje preseka	CIE $L^*a^*b^*$ merenja boje preseka			Količina boje, mg/kg		Identifikovana boja ^{d)}
		L^*	a^*	b^*	HPLC određivanje	Izračunato po modelu	
1	3,08±0,20 ^{b)}	67,60±0,33	15,63±0,23	16,12±0,19	3,35±0,16	6,76±0,34	E120
2	4,92±0,20	74,71±0,26	14,30±0,07	13,78±0,14	2,82±0,14	6,50±0,08	E120
3	4,67±0,26	75,79±2,69	13,08±1,85	11,73±0,38	3,27±0,15	4,17±2,31	E120
4	2,83±0,26 ^{a)}	66,25±0,55	16,21±0,18	20,73±0,18	74,95±0,63	73,32±3,81	E129
5	3,00±0,00 ^{a)}	68,11±0,38	15,14±0,26	17,63±0,24	42,45±0,14	41,83±3,08	E129
6	3,25±0,27 ^{b)}	72,78±0,64	8,83±0,20	13,67±0,11	ND ^{c)}	-3,99±0,20	-
7	3,25±0,27 ^{b)}	63,97±0,46	19,29±0,13	14,92±0,09	3,72±0,11	11,49±0,17	E120
8	4,83±0,26	69,01±0,35	15,61±0,17	12,88±0,09	3,39±0,14	6,35±0,22	E120
9	4,92±0,20	72,24±0,30	14,77±0,14	11,96±0,06	3,07±0,14	5,86±0,16	E120
10	3,58±0,49	68,63±0,53	16,57±0,05	11,98±0,18	3,98±0,15	7,65±0,21	E120
11	3,00±0,32 ^{a)}	66,96±0,44	15,71±0,18	13,65±0,36	3,34±0,14	5,95±0,35	E120
12	2,50±0,32 ^{a)}	68,41±0,26	14,31±0,18	13,90±0,21	2,44±0,16	4,10±0,29	E120
13	3,25±0,65 ^{a)}	69,48±0,44	15,26±0,23	14,97±0,12	19,94±0,23	18,76±2,13	E129
14	2,25±0,50 ^{b)}	68,02±0,62	15,14±0,21	15,57±0,13	2,87±0,13	5,89±0,76	E120
15	4,63±0,25	66,83±0,19	17,01±0,08	12,56±0,15	3,55±0,09	7,90±0,18	E120
16	4,75±0,29	71,35±0,19	14,87±0,09	13,04±0,07	2,92±0,22	5,99±0,22	E120
17	3,38±0,48 ^{a)}	68,92±1,00	14,78±0,13	17,12±0,47	40,38±0,52	37,33±8,17	E129
18	3,38±0,25 ^{a)}	62,53±0,35	19,83±0,24	14,50±0,10	4,69±0,21	11,78±0,42	E120
19	3,00±0,41 ^{a)}	63,60±0,46	19,16±0,19	15,68±0,21	4,32±0,15	11,33±0,21	E120
20	4,00±0,00	67,84±0,19	15,86±0,15	14,32±0,09	3,39±0,21	6,75±0,26	E120
21	4,13±0,25	68,82±0,21	15,45±0,07	14,74±0,07	3,58±0,27	6,52±0,09	E120

^{a)}Boja preseka intenzivna; ^{b)}boja preseka slabo izražena; ^{c)}ND – nije detektovano prisustvo boje; ^{d)}identifikacija boje na osnovu UV spektra dobijenog iz PDA podataka

izvodima od mesa, zajedno sa eksperimentalno određenim vrednostima tačno-hromatografskom metodom, su, takođe, prikazane u tabeli 7.

DISKUSIJA

Senzorskim ocenjivanjem boje preseka eksperimentalnih proizvoda utvrđeno je da su proizvodi kojima je dodata boja imali bolju prihvatljivost od kontrolnog proizvoda. Samo proizvod sa najvećom količinom (12,5 mg/kg) dodate boje E 120 je ocenjen lošije od kontrolnog proizvoda, jer je njegova boja bila previše intenzivna. Kolorimetrijskim merenjem boje preseka eksperimentalne „pariske kobasice“ dobijeni su podaci za svetloću boje preseka, L^* , za udeo crvene boje, a^* , i za udeo žute boje, b^* . Eksperimentalna „pariska kobasica“ sa dodatkom boja imala je manje vrednosti za svetloću, u odnosu na proizvod bez dodate boje. Takođe, može da se konstatuje da je sa porastom količine dodate boje opadala vrednost L^* , kod sve tri serije eksperimentalne „pariske kobasice“. Kod proizvoda kojima su dodate boje E 124 i E 129 vrednosti L^* su se linearno smanjivale sa povećanjem količine boje, dok kod „pariske kobasice“ sa dodatkom bojom E 120, vrednosti L^* su, sa

povećanjem količine boje u proizvodima, nelinearno opadale.

Rezultati kolorimetrijskog određivanja boja E 120, E 124 i E 129 u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“ pokazuju da je između vrednosti a^* i količina sve tri boje u proizvodima postojala linearna zavisnost. Najveći porast vrednosti a^* sa povećanjem količine dodate boje je ustanovljen kod „pariske kobasice“ sa dodatkom bojom E 120 (nagib prave 0,66), zatim kod proizvoda sa dodatkom bojom E 129 (nagib prave 0,26), a najmanji porast je ustanovljen kod proizvoda sa dodatkom bojom E 124 (nagib prave 0,20), slika 1. Uzimajući u obzir činjenicu da su količine boje E 120, koje su korišćene pri izradi „pariske kobasice“, bile manje od količina druge dve boje (tabela 2), može se zaključiti da ova boja intenzivno boji proizvode od mesa.

Kolorimetrijska merenja udela žute boje (tabela 3) su pokazala da je eksperimentalna „pariska kobasica“ sa dodatim veštačkim bojama E 124 i E 129 imala veće vrednosti za b^* u odnosu na kontrolni proizvod. Eksperimentalna „pariska kobasica“ kojoj je dodata boja E 120 imala je manju vrednost za b^* u odnosu na proizvode sa sintetičkim bojama E 124 i E 129 i kontrolni proizvod. Na osnovu prikazanih rezultata može da se

konstatuje i da vrednost b^* opada sa povećanjem količine dodate boje, kod proizvodnih partija „pariske kobasice“ kojima je dodata boja E 120. Kod eksperimentalne „pariske kobasice“ sa dodatim sintetičkim bojama, sa porastom količine dodate boje vrednost b^* blago raste.

Rezultati hromatografskih ispitivanja sadržaja boja u eksperimentalnoj „pariskoj kobasici“, koji su prikazani u tabeli 4, pokazuju da su povratni prinosi boja u okviru analitičkih očekivanja, osim u slučaju eksperimentalne „pariske kobasice“ iz proizvodne partije 4, kod koje je vrednost povratnog prinosa bila ispod 80 %. Imajući u vidu da je eksperimentalna „pariska kobasica“ proizvedena u industrijskom pogonu, gde uslovi eksperimentalne proizvodnje nisu optimalni, ovakav rezultat povratnog prinosa može da bude prihvatljiv. U literaturi postoje podaci o primeni HPLC metode sa ASE ekstrakcijom, ali se ona odnosi samo na određivanje veštačkih boja. [18]. Rezultati povratnog prinosa za E 124 i E 129 (97,61–101,30% i 99,91–101,67%, redom), koji su dobijeni u okviru naših istraživanja, su veći u poređenju sa navedenim literaturnim podacima za povratni prinos boje E 124 (76,9–83,6%) i boje E 129 (80,9–84,6%).

Wu i Sun [32] su prikazali obiman pregled metoda merenja boje u širokom spektralnom opsegu, koje su korišćene za kvalitativnu i kvantitativnu kontrolu kvaliteta hrane. Autori navode da je CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda jedna od najčešće korišćenih, zahvaljujući uniformnoj distribuciji boja i zbog činjenice da je najpribližnja percepciji boje ljudskog oka. Međutim, sve navedene metode se koriste za predikciju osobina boje i za senzorsko ocenjivanje pri kontroli kvaliteta hrane. Većina metoda koristi kompleksne algoritme i multivarijantne metode za kalibraciju, kao što je regresija metodom analize glavnih komponenti (PCA-R), ili regresija metodom delimičnih najmanjih kvadrata (PLS-R). Metoda kompjuterske obrade digitalnih snimaka proizvoda [26] je primenjena za određivanje sadržaja šećera u belom grožđu, uz PLS-R kalibraciju. Ove metode se koriste pri obradi skupa podataka, gde je broj prediktora veći od broja uzoraka u kalibracionom setu, kao što je slučaj kod digitalnih fotografija. Sa druge strane, MLR je primenljiva u slučaju kada je broj kalibracionih uzoraka veći od broja prediktora [29]. Stoga je, u ovom istraživanju, MLR korišćena za kalibraciju CIE $L^*a^*b^*$ metode za određivanje boja u proizvodima od mesa, jer se primenjeni kalibracioni set sastojao od 10 eksperimentalnih proizvoda na čijim presecima su merene vrednosti tri prediktorske promenljive, L^* , a^* i b^* .

Pouzdanost MLR modela za predikciju rezultata može se proceniti na osnovu vrednosti R^2 i $RMSE$. Vrednosti R^2 za sva tri MLR modela (tabela 5) su bliske vrednosti 1, pri čemu je najveća vrednost dobijena kod modela za boju E 129, a najmanja za E 124. $RMSE$ vrednost je najmanja kod modela za boju E 120, a najveća

kod modela za boju E 124. Prikazane R^2 i $RMSE$ vrednosti pokazuju da su modeli za boje E 120 i E 129 pouzdaniji, odnosno da se mogu uspešnije primeniti kod procene količine tih boja u barenim kobasicama od MRL modela za boju E 124. Na osnovu vrednosti verovatnoća ($\text{Prob}>|t|$) dobijenih analizom rezultata MLR, koje su prikazane u tabeli 5, može da se konstatuje da je udeo crvene boje, odnosno vrednost a^* , najuticajniji faktor kod određivanja sadržaja boje CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskom metodom kod svih eksperimentalnih proizvoda. Ovakav zaključak je logičan, s obzirom da dodavanje crvene prehrambene boje u proizvode od mesa najviše utiče na promenu vrednosti a^* . Poređenjem količina boja u eksperimentalnim proizvodima koje su određene tačnom hromatografijom sa količinama boja izračunatim po CIE $L^*a^*b^*$ modelu, dvosmernim t -testom, za boje E 120 i E 129 je potvrđeno dobro slaganje rezultata u celom opsegu ispitivanja, dok je za boju E 124 model pokazao odstupanje pri koncentraciji od 25 mg/kg. Odstupanje može da bude posledica nelinearne zavisnosti koncentracije boje od kolorimetrijskih vrednosti u mernom opsegu, što je, ujedno, uzrok veće vrednosti koja je dobijena za $RMSE$ kod ovog modela.

Rezultati primene razvijenih $L^*a^*b^*$ modela na proizvodima od mesa sa tržišta (tabela 7) pokazuju da se pomoću CIE $L^*a^*b^*$ modela dobijaju veće vrednosti za sadržaj E 120 nego primenom metode tačne hromatografije. Količine boje E 120 u barenim kobasicama dobijene hromatografskim ispitivanjem bile su u intervalu od 2,44 do 4,69 mg/kg, a CIE $L^*a^*b^*$ modelom u intervalu od 4,10 do 11,78 mg/kg. Razlike između rezultata dobijenih po CIE $L^*a^*b^*$ modelu i na osnovu HPLC određivanja mogu poticati od, na primer, količine crvene paprike u ekstraktu paprike dodatom u toku izrade fino usitnjenih barenih kobasica [27,28]. CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijskom metodom se meri zbir svih obojenih konstituenata na površini preseka proizvoda, a dodata boja je samo jedna komponenta tog zbira. Pošto je kolorimetrijska CIE $L^*a^*b^*$ metoda razvijena za procenu količine boje, a ne za precizna određivanja, može se smatrati da su dobijeni rezultati prihvatljivi.

CIE $L^*a^*b^*$ model za procenu količine boje E 129 u fino usitnjenim barenim kobasicama pokazuje mnogo bolje slaganje rezultata sa rezultatima koji su dobijeni HPLC metodom. Pošto je ispitan mali broj uzoraka, samo četiri, nije moguće izvesti pouzdan zaključak o primeni postavljenog modela kod proizvoda sa tržišta. S obzirom da ni u jednom uzorku iz prometa nije dokazano prisustvo boje E 124, model nije bilo moguće proveriti kod tih proizvoda.

ZAKLJUČAK

Eksperimentalni proizvodi od mesa, fino usitnjene barene kobasice u tipu „pariska kobasica“, kojima su u

toku izrade dodavane različite količine boja E 120, E 124 i E 129, na osnovu senzornog ocenjivanja boje preseka, osim proizvodne partije 4, su imali prihvatljiviju boju preseka od kontrolnog proizvoda i bili su pogodan supstrat za kalibraciju CIE $L^*a^*b^*$ metode za procenu količina boja kod proizvoda od mesa. Merenjima boje preseka eksperimentalnih proizvoda od mesa izrađenih sa različitim količinama dodatih boja, metodom CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrije, konstatovano je da se L^* vrednost (intezitet svetlosti) smanjuje, da se a^* vrednost (udeo crvene boje) povećava i da se b^* vrednost (udeo žute boje), kod proizvoda sa dodatom E 120 bojom, smanjuje, a da se povećava kod proizvoda sa veštačkim azo bojama (E 124 i E 129).

Kalibracijom rezultata CIE $L^*a^*b^*$ merenja prema rezultatima HPLC određivanja primenom MLR modela, razvijena je brza kolorimetrijska metoda za procenu količina boja kod fino usitnjenih proizvoda od mesa. Pouzdanost MLR modela je procenjena na osnovu vrednosti R^2 i $RMSE$. Utvrđeno je da kod rezultata dobijenih MLR modelima za procenjivanje količina boja E 120 i E 129, na osnovu CIE $L^*a^*b^*$ merenja boje preseka kod eksperimentalnih proizvoda ne postoji značajnost razlike izračunatih vrednosti sa rezultatima dobijenim HPLC određivanjem. Proverom modela za procenu količine boje E 124 je utvrđeno statistički značajno odstupanje kod proizvoda sa količinom od 25 mg/kg boje.

Primenom CIE $L^*a^*b^*$ i HPLC metoda, boje su utvrđene kod 95,24% ispitanih fino usitnjenih barenih kobasica sa tržišta, kod kojih je upotreba prirodnih boja dozvoljena. Od toga, 80% uzoraka barenih kobasica sadržalo je prirodnu boju E 120 (2,44–4,69 mg/kg), a 20% uzoraka veštačku boju E 129 (19,94–74,95 mg/kg), čija je upotreba zabranjena.

Može da se konstatuje da je CIE $L^*a^*b^*$ kolorimetrijska metoda, koja je razvijena u okviru ovih ispitivanja, nedestruktivna, pogodna za rutinski rad i obradu velikog broja uzoraka i da se može primeniti za brzo procenjivanje sadržaja prehrambenih boja u proizvodima od mesa.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na pružanju finansijske pomoći za realizaciju ovoga rada (Projekat III 46009).

LITERATURA

- [1] D.J. Troy, J.P. Kerry, Consumer perception and the role of science in the meat industry, *Meat Sci.* **86** (2010) 214–226.
- [2] M. Šmelcerović, D. Đorđević, M. Novaković, Textile dyeing by dyestuffs of natural origin, *Hem. ind.* **60** (2006) 120–128.
- [3] Pravilnik o prehrambenim aditivima, *Sl. glasnik RS* br. 63/2013.
- [4] D.Ž. Mijin, Photodegradation of synthetic dyes under visible and solar light, *Hem. ind.* **59** (2005) 332–338.
- [5] 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 J.* 2009; 7(11):1327, 39.
- [6] 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 J.* 2009; 7(11):1328, 39.
- [7] D. McCann, A. Barrett, C. Cooper, D. Crumpler, L. Dalen, K. Grimshaw, E. Kitchin, K. Lok, L. Porteous, E. Prince, E. Sonuga-Barke, J. O'Warner, J. Stevenson, 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** (2007) 1560–1567.
- [8] C. Souvage, Controverse l'hypersensibilité aux additifs alimentaires est une réalité clinique : pour (Controversy hypersensitivity to food additives is a clinical reality: For), *Rev. Fr. Allergol.* **50** (2010) 288–291.
- [9] M.O. Elhkim, F. Fanny Héraud, N. Bemrah, F. Gauchard, T. Lorino, C. Lambré, J.M. Frémy, J.M. Jean-Poul, New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine. An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France, *Regul. Toxicol. Pharm.* **47** (2007) 308–316.
- [10] H.W. Park, C.H. Park, S.H. Park, J.Y. Park, H.S. Park, J. Yang, K.M. Ahn, K.H. Kim, J.W. Oh, K.E. Kim, B.Y. Pyun, H.B. Lee, K.U. Min, Dermatologic adverse reactions to 7 common food additives in patients with allergic diseases: A double-blind, placebo-controlled study, *J. Allergy Clin. Immun.* **121** (2008) 1059–1061.
- [11] S. Altinöz, S. Toptan, Simultaneous determination of Indigotin and Ponceau-4R in food samples by using Vierordt's method, ratio spectra first order derivative and derivative UV spectrophotometry, *J. Food Compos. Anal.* **16** (2003) 517–530.
- [12] E. Dinc, E. Baydan, M. Kanbur, F. Onur, 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** (2002) 579–594.
- [13] A.H. Alghamdi, H.M. Alshammery M.A. Abdalla and A.F. Alghamdi, Determination of Carmine Food Dye (E120) in Foodstuffs by Stripping Voltammetry, *J. AOAC Int.* **92** (2009) 1454–1459.
- [14] S. Combeau, M. Chatelut, O. Vittori, Identification and simultaneous determination of Azorubin, Allura red and Ponceau 4R by differential pulse polarography: application to soft drinks, *Talanta* **56** (2002) 115–122.
- [15] E. Andrzejewska, Detection of natural organic dye – Cochineal – in meat products, *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **32** (1981) 315–318.

- [16] ISO 13496:2000(E), Meat and meat products – Detection of colouring agents – Method using thin-layer chromatography, 2000.
- [17] N. Yoshioka, K. Ichihashi, Determination of 40 synthetic colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection, *Talanta* **74** (2008) 1408–1413.
- [18] Q.G. Liao, W.H. Li, L.G. Luo, Applicability of accelerated solvent extraction for synthetic colorants analysis in meat products with ultrahigh performance liquid chromatography–photodiode array detection, *Anal. Chim. Acta* **716** (2012) 128–132.
- [19] M. Ryvolova, P. Taborsky, P. Vrabel, P. Krasensky, J. Preisler, Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr., A* **1141** (2007) 206–211.
- [20] CIE Commission Internationale de l'Eclairage, International Commission on Illumination, <http://www.cie.co.at/>
- [21] Z. Pejkovski, A. Silovska-Nikolova, K. Belichovska, L. Gasperlin, T. Polak, B. Žlender, S. Lilić, H. Ockerman, Impact of different vegetable fats and oils on instrumentally measured color and texture of processed chicken sausages, *Tehnologija mesa* **50** (2009) 238–242.
- [22] D. Vasilev, I. Vuković, V. Tomović, M. Jakanović, N. Vasiljević, M. Milanović-Stevanović, M. Tubić, Some important physical, physico-chemical and sensory quality properties of functional fermented sausages, *Tehnologija mesa* **50** (2009) 342–350.
- [23] C. Sheridan, M. O'Farrell, E. Lewis, C. Flanagan, J. Kerry and N. Jackman, A comparison of CIE $L^*a^*b^*$ and spectral methods for the analysis of fading in sliced cured ham, *J. Opt. A-Pure Appl. Op.* **9** (2007) S32–S39.
- [24] D. Ansorena, M.P. De Peña, I. Astiasarán, J. Bello, Colour evaluation of chorizo de Pamplona, a Spanish dry fermented sausage: Comparison between the CIE $L^*a^*b^*$ and the Hunter lab systems with illuminants D65 and C, *Meat Sci.* **46** (1997) 313–318.
- [25] R. Korifi, Y. Le Dréau, J.F. Antinelli, R. Valls, N. Dupuya, CIE $L^*a^*b^*$ color space predictive models for colorimetry devices – Analysis of perfume quality, *Talanta* **104** (2013) 58–66.
- [26] F.J. Rodríguez-Pulido, B. Gordillo, M.L. González-Miret, F.J. Heredia, Analysis of food appearance properties by computer vision applying ellipsoids to colour data, *Comput. Electron. Agr.* **99** (2013) 108–115.
- [27] J. Fernández-López, J.A. Pérez-Alvarez, E. Sayas-Barberá, F. López-Santoveña, Effect of Paprika (*Capsicum annum*) on Color of Spanish-type Sausages During the Resting Stage, *J. Food Sci.* **67** (2002) 2410–2414.
- [28] M. Alvarez-Ortí, R. Gómez, J. E. Pardo, Manufacture of red line meat products with higher colour stability and improved visual attractiveness, *J. Food Agric. Environ.* **7** (2009) 16–18.
- [29] J. N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 5th ed., Pearson Education Limited, Harlow, 2005.
- [30] SRPS ISO 6558 2001. *Senzorske analize, Metodologija, Opšte uputstvo*, 2001.
- [31] C.W. Dunnett, Pairwise multiple comparisons in the homogeneous variance, unequal sample size case, *J. Am. Stat. Assoc.* **75** (1980) 789–795.
- [32] D. Wu, D.-W. Sun, Colour measurements by computer vision for food quality control – A review, *Trends Food Sci. Tech.* **29** (2013) 5–20.

SUMMARY

THE CHEMOMETRIC APPROACH IN DEVELOPMENT OF THE COLORIMETRIC METHOD FOR THE ESTIMATION OF FOOD COLORANTS IN MEAT PRODUCTS

Radivoj B. Petronijević¹, Vesna F. Matekalo-Sverak¹, Aurelija T. Spirić¹, Ilija K. Vuković², Jelena A. Babić¹, Milan P. Milijašević¹, Dejana K. Trbović¹

¹*Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia*

²*University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia*

(Scientific paper)

The aim of this research was to develop a novel colorimetric method based on mathematical models, by multiple linear regression (MLR), from the CIE $L^*a^*b^*$ measurements and data of the HPLC determination of food colorants. Calibration set of 10 production batches of finely grinded cooked sausage with added food colorants was manufactured in industrial conditions as follows: one control batch and 9 products with various quantities of added food colorants: E120 (3.4, 7.5 and 12.5 mg/kg), E 124 (5.0, 15.0 and 25.0 mg/kg) and E 129 (5.0, 15.0 and 25.0 mg/kg). The estimation of the added food colorants was assessed by measuring L^* , a^* and b^* parameters of cross-section. The quantification of food colorants was achieved by HPLC-PDA. Food colorants were extracted from meat products using accelerated solvent extraction (ASE). Quantification of food colorants was achieved in the range from 1 to 100 mg/kg, and recovery values were from 76.1 to 107.04%, for E 120, from 97.61 to 101.03%, for E 124 and from 99.91 to 101.67% for E 129. Correlation of the results obtained using HPLC and colorimetric measuring data was assessed by multiple linear regression (MLR). The results from colorimetric and chromatographic determinations in four experimental batches (three batches with different quantities of food colorants and one control batch) were used for calibration. The coefficients of determination (R^2) for linear models in experimental batches were 0.954, for E 124, 0.987, for E 120 and 0.993, for E 129. The correlation functions of food colorant quantities and corresponding $L^*a^*b^*$ values were established. The obtained mathematical models were tested for the estimation of the content of dyes in 21 samples of finely grinded cooked sausages purchased in retail stores. Food colorants were confirmed in 20 samples (95.24%), and one sample (4.76%) did not contain any of these compounds. Out of the positive samples, sixteen samples (80.00%) contained E 120, while four samples (20.00%) contained E 129. Food colorant E124 was not established in any of the analysed samples. The colorimetric CIE $L^*a^*b^*$ method might be used during sensory evaluation of meat products for the assessment of the added food colorants.

Keywords: Food colorants • CIE $L^*a^*b^*$
Colorimetric method • HPLC-PDA • MLR