

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Saša Ajredini

**RAZVOJ I VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE
UGLJIKOHIDRATA U UZORCIMA HRANE ZA DOJENČAD
U SVRHU PRAKTIČNE SIGURNOSTI**

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda pod vodstvom dr. sc. Mirjane Hruškar, izv. prof. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. HRANA ZA DOJEN AD	1
1.1.1. Oblici hrane za dojen ad	4
1.1.2. Ugljikohidrati u hrani za dojen ad	4
1.1.3. Današnji trendovi u obogaivanju hrane za dojen ad	5
1.1.4. Sigurnost i nedostaci hrane za dojen ad	5
1.2. METODE ODREIVANJA UGLJIKOHIDRATA	6
1.2.1. Visoko djelotvorna tekuinska kromatografija.....	7
1.2.2. Visoko djelotvorna anion-izmjenjivaka kromatografija	7
1.2.3. Plinska kromatografija	8
1.2.4. Spektroskopske metode	8
1.2.5. Ostale metode	8
1.3. VALIDACIJA ANALITI KE METODE	9
1.3.1. Parametri validacije	11
1.3.2. Mjerna nesigurnost	16
2. OP I I SPECIFI NI CILJEVI RADA.....	17
3. MATERIJALI I METODE RADA.....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Ureaji i oprema	18
3.1.2. Kemikalije i standardi	18
3.1.3. Uzorci.....	19
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Razvoj i validacija metode.....	19
3.2.1.1. Selektivnost	19

3.2.1.2. Linearnost i područje.....	19
3.2.1.3. Preciznost	20
3.2.1.4. Točnost.....	20
3.2.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije	20
3.2.2. Određivanje udjela ugljikohidrata u hrani za dojenčad i ispitivanje mogućih promjena uslijed skladištenja.....	20
3.2.2.1. Priprema mobilne faze	21
3.2.2.2. Priprema uzorka	21
3.2.2.3. Uvjeti rada	21
3.2.3. Analiza podataka.....	21
4. REZULTATI.....	23
4.1. SELEKTIVNOST.....	24
4.2. LINEARNOST I PODRUČJE.....	25
4.3. PRECIZNOST	33
4.4. TOČNOST.....	34
4.5. GRANICA DETEKCIJE I GRANICA KVANTIFIKACIJE.....	38
4.6. ODREĐIVANJE UDJELA UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJENČAD I ISPITIVANJE MOGUĆIH PROMJENA USLIJED SKLADIŠTENJA.....	39
5. RASPRAVA	52
5.1. VALIDACIJA METODE.....	52
5.1.1. Selektivnost.....	52
5.1.2. Linearnost i područje	53
5.1.3. Preciznost.....	54
5.1.4. Točnost.....	56
5.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije.....	57

5.2. ODREĐIVANJE UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJENČAD.....	58
5.3. ISPITIVANJE PROMJENE UDJELA UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJENČAD USLIJED SKLADIŠTENJA	60
6. ZAKLJUČCI	63
7. ZAHVALE	65
8. POPIS LITERATURE.....	66
9. SAŽETAK.....	82
10. SUMMARY.....	83
11. ŽIVOTOPIS.....	84

1. UVOD

1.1. HRANA ZA DOJEN AD

Dojenje je zlatni standard u hranjenju dojenadi [1] radi nutritivnih, metaboličkih [2,3,4,5] i fizioloških prednosti koje pruža [6,7,8,9] te psihološkog uinka [10,11]. Ima važnu ulogu u smanjenju rizika od iznenadne smrti [12,13,14] i mnogih bolesti u dojenadi koja dobi [15,16,17,18,19], djetinjstvu [20,21,22,23], odrasloj dobi [24,25,26,27,28,29,30,31,32] te razvoju inteligencije [33,34]. Sastav majinog mlijeka nije konstantan, a mijenja se pod utjecajem raznih faktora [35,36,37,38]. Ono koje dojenadi osigurava sve potrebne tvari do 6. mjeseca života, do kada se dojenje isključivo i preporučuje [39,40,41,42]. Nakon 6. mjeseca života dolazi do povećanja potrebe za energijom i nutrijentima [43] pa se preporučuje nastavak dojenja uz postepeno uvođenje krute hrane do druge godine života djeteta i dulje [44,45]. Osim brojnih prednosti za dijete, dojenje se pozitivno odražava i na zdravlje majke [46,47,48,49,50,51].

Kada je dojenje nemoguće, nedovoljno ili nepoželjno potrebno ga je nadomjestiti adekvatnom prehranom. Hrana za dojenad predstavlja adekvatnu zamjenu majinom mlijeku, no ne može ga u potpunosti zamijeniti [52,53,54,55,56]. Oblikovana je kako bi dojenadi pružila sve nutrijente potrebne za optimalan rast, razvoj i očuvanje zdravlja [57,58]. Prema Pravilniku [59] se, s obzirom na starost djeteta, dijeli na početnu (do 6. mjeseca života), prijelaznu (od 6. do 12. mjeseca života) i hranu za malu djecu (od 1. do 3. godine života). Početna hrana jest prva hrana za posebne prehrambene potrebe dojenadi u prvim mjesecima života koja zadovoljava prehrambene potrebe dojenadi koje uvođenje odgovarajućeg dodatnog hranjenja. Prijelazna hrana jest prva hrana za posebne prehrambene potrebe dojenadi kada se uvodi odgovarajuće dodatno sve raznolikije, pretežno tekuće hranjenje. U Tablici 1. naveden je dozvoljeni sastav prijelazne hrane za dojenad [59].

Tablica 1. Dozvoljeni sastav prijelazne hrane za dojen ad [59]

Komponenta		Jedinica	Minimum	Maksimum
Energija		kcal/100 mL	60	70
Proteini	Kravlje mlijeko	g/100 kcal	1,8	3
	Izolati bjelan evina soje*	g/100 kcal	2,25	3,5
	Hidrolizati bjelan evina	g/100 kcal	2,25	3,5
Lipidi	Ukupni	g/100 kcal	4	6
	Linolna kiselina	g/100 kcal	0,3	1,2
	-linolenska kiselina	mg/100 kcal	50	-
	Laurinska i miristinska kiselina	% lipida	-	20
	Trans masne kiseline	% lipida	-	3
	Eruka kiselina	% lipida	-	1
	n-3 masne kiseline	% lipida	-	1
	n-6 masne kiseline	% lipida	-	2
	Dokoheksaenska kiselina (DHA)	Ne smije prekora iti sadržaj n-6 masnih kiselina		
	Eikosapentaenska kiselina (EPA)	Ne smije prekora iti sadržaj DHA		
Fosfolipidi		g/L	-	2
Ugljikohidrati	Ukupni	g/100 kcal	9	14
	Laktoza [#]	g/100 kcal	4,5	-
	Saharoza, fruktoza, med	% ugljikohidrata	-	20
	Glukoza ^α	g/100 kcal	-	2
	Frukto- i galakto-oligosaharidi (1:9)	g/100 ml	-	0,8
Vitamini	A ¹	μg RE/100 kcal	60	180
	D ²	μg/100 kcal	1	2,5
	E ³	mg -TE/100 kcal	0,5	5
	K	μg/100 kcal	4	25
	Tiamin	μg/100 kcal	60	300
	Riboflavin	μg/100 kcal	80	400
	Niacin ⁴	μg/100 kcal	300	1500

Tablica 1. Dozvoljeni sastav prijelazne hrane za dojen ad – nastavak [59]

Komponenta		Jedinica	Minimum	Maksimum
Vitamini	B ₆	µg/100 kcal	35	175
	B ₁₂	µg/100 kcal	0,1	0,5
	Pantotenska kiselina	µg/100 kcal	400	2000
	Folna kiselina	µg/100 kcal	1	50
	C	µg/100 kcal	10	30
	Biotin	µg/100 kcal	1,5	7,5
Mineralne tvari i elementi u tragovima	Željezo ⁵	mg/100 kcal	0,6	2
	Željezo ⁶	mg/100 kcal	0,9	2,5
	Fosfor ⁵	mg/100 kcal	25	90
	Fosfor ⁶	mg/100 kcal	30	100
	Kalcij	mg/100 kcal	50	140
	Omjer kalcija i fosfora	mg/mg	1:01	1:02
	Magnezij	mg/100 kcal	5	15
	Natrij	mg/100 kcal	20	60
	Klorid	mg/100 kcal	50	160
	Kalij	mg/100 kcal	60	160
	Mangan	µg/100 kcal	1	100
	Flor	µg/100 kcal	-	100
	Jod	µg/100 kcal	10	50
	Selen	µg/100 kcal	1	9
	Bakar	µg/100 kcal	35	100
Cink	mg/100 kcal	0,5	1,5	
Nukleotidi		mg/100 kcal	-	5
Taurin		mg/100 kcal	-	12

* sa ili bez proteina kravljeg mlijeka

ne primjenjuje se na prijelaznu hranu za dojen ad, u kojoj izolati bjelan evina soje predstavljaju više od 50 % ukupnog sadržaja bjelan evina

^α smije se dodavati samo hrani za nastavak prehrane dojen adi, proizvedenoj od hidrolizata bjelan evina

¹ RE = svi ekvivalenti transretinola

² U obliku holekalciferola, od ega 10 µg = 400 i.u. vitamina D.

³ -TE = ekvivalent d- -tokoferola.

⁴ Niacin u gotovu, formiranom obliku.

⁵ Prijelazna hrana proizvedena od bjelan evina kravljeg mlijeka ili hidrolizata bjelan evina.

⁶ Prijelazna hrana proizvedena od izolata bjelan evina iz soje, posebno ili u mješavini s bjelan evinama kravljeg mlijeka.

1.1.1. Oblici hrane za dojen ad

Hrana za dojen ad se dijeli na hranu koja se primjenjuje kod zdrave dojen adi i specijalnu hranu koja ima primjenu kod dojen adi s dijagnosticiranim nutritivnim problemima [60]. Može biti bazirana na kravljem mlijeku, bjelan evinama soje ili hidroliziranim bjelan evinama [57,61].

Hrana za dojen ad bazirana na kravljem mlijeku naj eš e se primjenjuje kod zdrave dojen adi bez prisutnosti alergija u obiteljskoj povijesti [62]. Laktoza je, u ve ini takve hrane, glavni izvor ugljikohidrata, no postoji i hrana koja ne sadrži laktozu te se primjenjuje u prehrani dojen adi s netolerancijom laktoze. Hrana bazirana na bjelan evinama soje ima primjenu kod veganske dojen adi, dojen adi s galaktosemijom i netolerancijom laktoze [63]. U njoj se ugljikohidrati nalaze u obliku maltodekstrina, kukuruznog škroba i ponekad saharoze [60]. Hrana bazirana na hidroliziranim bjelan evinama primjenjuje se kod dojen adi s ozbiljnim nutritivnim problemima ili dojen adi alergi ne na kravlje mlijeko [60] gdje je dokazana njena u inkovitost [64]. Prema stupnju hidrolize, može se podijeliti na hranu baziranu na visoko ili djelomi no hidroliziranim bjelan evinama. Ugljikohidrati se u takvoj hrani nalaze u obliku maltodekstrina ili polimera glukoze [60].

1.1.2. Ugljikohidrati u hrani za dojen ad

Ugljikohidrati su važan izvor energije u prehrani dojen adi. Laktoza je dominantni probavljivi ugljikohidrat maj inog mlijeka pa zauzima važno mjesto i u hrani za dojen ad. Osigurava oko 40 % dnevnog energetskeg unosa. Pomaže apsorpciju vode, mineralnih tvari kao što su natrij, kalcij [61], magnezij, cink i željezo [65]; ima važnu ulogu u izgradnji živ anog sustava te rastu kože, kostiju i hrskavice dojen adi [66]; ima pozitivan fiziološki i prebiotiki efekt [61].

Prema Pravilniku [59], po etna hrana za dojen ad smije sadržavati laktozu, maltozu, saharozu, glukozu, maltodekstrine, glukozni ili osušeni glukozni sirup, aktivirani i želatinizirani škrob koji su prirodno bez glutena, dok prijelazna hrana smije sadržavati i fruktozu te med. Koletzko i sur. [61] preporu uju uporabu laktoze i škroba, no ne i glukoze radi mogu ih neenzimskih reakcija s bjelan evinama i formiranja Maillardovih produkata tijekom toplinske obrade hrane, iako je u maj inom mlijeku prona ena u malim koli inama. Ne preporu a se uporaba ni fruktoze i saharoze radi mogu eg razvoja hipoglikemije, pothranjenosti, povra anja, ciroze jetre ili iznenadne smrti. Prema standardu Codex-a Alimentarius [67] preferira se dodavanje polimera glukoze i laktoze kao izvora ugljikohidrata u hrani baziranoj na bjelan evinama kravljeg mlijeka i hidroliziranim bjelan evinama. Dodatak fruktoze i saharoze treba se izbjegavati. Jedino prethodno termi ki obra eni i/ili želatinizirani škrob koji prirodno ne sadrži gluten se preporu a dodavati u hranu i to do 30 %-tnog udjela u ukupnoj koli ini ugljikohidrata [61,67].

1.1.3. Današnji trendovi u oboga ivanju hrane za dojen ad

U cilju postizanja sastava što bližeg maj inom mlijeku, danas se u hranu za dojen ad dodaju mnoge neesencijalne, no vrlo korisne tvari prona ene u maj inom mlijeku. One uklju uju nukleotide [68], prebiotike i probiotike [69,70,71,72,73,74], dugolan ane polinezasi ene masne kiseline [75,76,77,78] i druge tvari. Kada u hrani za dojen ad nisu prisutne ne dolazi do njihovog nedostatka, no kada se dodaju zna ajno utje u na dojen e [52].

1.1.4. Sigurnost i nedostaci hrane za dojen ad

Hrana za dojen ad se esto povezuje s odre enim rizikom za zdravlje. Utvr eno je da dojen ad u razvijenim zemljama koja je hranjena hranom za dojen ad ima pove ani rizik od nespecifi nog gastroenteritisa, atopi nog dermatitisa, astme, pretilosti, dijabetesa, ekcema,

nekroti nog enterokolitisa i autizma od onih dojenih [22,79,80]. Otkriveno je i da je suplementacija željeza u hrani za dojen ad povezana s nižim kvocijentom inteligencije te drugim zaostacima u neurološkom razvoju dojen adi [81]. Usto, hrana za dojen ad nije sterilna te se po život opasne infekcije kod dojen adi pripisuju kontaminaciji patogenim bakterijama, kao što je *Enterobacter sakazakii* [82,83,84,85,86] i *Salmonella enterica* [86,87] dok hrana bazirana na bjelan evinama soje sadrži fitoestrogene, koji potencijalno mogu smanjiti plodnost u dje aka i prouzro iti preuranjeni pubertet u djevoj ica [88].

Velika sli nost sastava hrane za dojen ad maj inom mlijeku nije adekvatan indikator sigurnosti i nutritivne adekvatnosti te hrane. Adekvatnost hrane za dojen ad bi se trebala procjenjivati usporedbom utjecaja na psihološke, biokemijske i funkcionalne parametre (rast i razvoj, markeri u plazmi, imunološki odgovor) kod dojen adi hranjene hranom za dojen ad i one dojene. Koletzko i sur. navode da bi trebala sadržavati sastojke u mjeri zadovoljenja nutritivnih zahtjeva ili radi drugog pozitivnog utjecaja [61]. Wu i sur. su ispitivali biokemijske razlike u serumu kod dojen adi hranjene maj inim mlijekom i one hranjene hranom za dojen ad te zaklju ili da razli ita prehrana rezultira razli itim biokemijskim svojstvima seruma [89].

1.2. METODE ODRE IVANJA UGLJIKOHIDRATA

Razvijeno je mnogo metoda za odre ivanje ugljikohidrata u hrani za dojen ad [90]. Neke od metoda su spektrofotometrijske, spektroskopske, kromatografske, titracijske, kolorimetrijske, elektroforetske te enzimске metode.

1.2.1. Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija

Visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je metoda koja postoji više od 50 godina, no njena je primjena u određivanju ugljikohidrata i danas najraširenija [91]. Uz primjenu detektora indeksa loma koristi se u inkovitu metodu za određivanje različitih ugljikohidrata (glukoza, fruktoza, saharoza, laktoza, galaktoza, laktuloza, maltoza) [90]. Ferreira i sur. [92] i Scott i Hatina [93] su pri određivanju ugljikohidrata u hrani za dojenčad koristili HPLC metodu uz primjenu detektora indeksa loma (RI detektor). Njene su karakteristike jednostavnost, točnost, reproducibilnost, osjetljivost, dobre separacijske mogućnosti, brzina i ekonomičnost [90,94]. Prikladna je za rutinske analize mono- i disaharida u hrani za dojenčad baziranoj na mlijeku te za praćenje mogućih promjena njenog sastava [90].

1.2.2. Visoko djelotvorna anion-izmjenjiva kromatografija

Visoko djelotvorna anion-izmjenjiva kromatografija (eng. *High Performance Anion-Exchange*, HPAE) je razvijena radi mogućnosti separacije ugljikohidrata. U kombinaciji s pulsni amperometrijskim detektorom (PAD) moguća je direktna kvantifikacija nederivatiziranih ugljikohidrata u vrlo malim količinama (pikomoli) s minimalnom količinom pripremljenog uzorka. Ova se metoda odlikuje odličnom rezolucijom, preciznošću i osjetljivošću za ugljikohidrate [95]. Koristi se za određivanje monosaharida (glukoze i fruktoze) i disaharida (laktoze, maltoze, saharoze, laktuloze) [90]. Kaine i Wolnik su tom metodom određivali ugljikohidrate u hrani za dojenčad [96].

1.2.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography*, GC) je metoda koju su razvili Troyano i sur. [97]. Njenom je primjenom moguće kvantificirati glukozu, galaktozu, mioinozitol, laktulozu i druge ugljikohidrate. Unatoč dobroj osjetljivosti ove metode, priprema uzorka je teška jer ugljikohidrati moraju biti derivatizirani. Ovom se metodom dobiva anomerski sastav pa se pojavljuje i više pikova za isti spoj te nije pogodna za rutinsko korištenje [90].

1.2.4. Spektroskopske metode

FT-Raman spektroskopija uz primjenu kemometričnih metoda kao što je PLS (eng. *partial least square* – parcijalnih najmanjih kvadrata) predstavlja dobru analitičku metodu za kvantitativno određivanje nutritivnih parametara u hrani za dojenčad i mlijeku u prahu. Ova je metoda jednostavna, brza i ne generira kemijske rezidue pa je stoga prikladna za primjenu u laboratorijima za kontrolu kvalitete. Metode temeljene na vibracijskoj spektroskopiji mogu biti alternativa u određivanju nutrijenata u hrani za dojenčad [98].

1.2.5. Ostale metode

U određivanju ugljikohidrata u hrani za dojenčad se primjenjuju i enzimске, spektrofotometrijske te kemijske metode. Njihov najveći nedostatak je nesto nemogućnost određivanja različitih ugljikohidrata istovremeno [94,99,100]. Lesniewicz i sur. [58] su Bertrandovom metodom [101] određivali laktozu u hrani za dojenčad koja se smatra adekvatnom metodom za određivanje laktoze u mlijeku i mliječnim proizvodima [102]. Zhang i sur. su primjenjivali metodu kapilarne elektroforeze uz primjenu elektrokemijske detekcije pri određivanju laktoze u mlijeku u prahu [103].

1.3. VALIDACIJA ANALITI KE METODE

Svakim se danom diljem svijeta razvijaju nove analiti ke metode. Analiti ki rezultat je temelj za donošenje odluka i ima značajan utjecaj na društvo u cjelini. Stoga je cilj analiti kih ispitivanja osiguravanje dosljednih, pouzdanih i točnih podataka, a validacija igra važnu ulogu u njegovom ostvarenju [104]. Riječ validacija potječe od lat. *validus* – jak, snažan, moćan i upućuje na nešto čemu je dokazana istinitost, na koristan i prihvatljiv standard [105]. Ona omogućuje dokazivanje da metoda zadovoljava namijenjenu svrhu [104,106], tj. kriterije prihvatljivosti postavljene od strane analitičara i krajnjeg korisnika ili potrošača, a koji opisuju njihove potrebe [107]. Samo se validacijom objektivno može predložiti svojstvena kvaliteta analiti ke metode [106]. Usko je povezana s razvojem metode i često nije moguće razlučiti kada razvoj završava, a validacija započinje. Kvaliteta analiti ke metode više ovisi o njenom razvoju, nego o validaciji [106] te bi dobro razvijenu metodu trebalo biti lako validirati [104]. Validacija analiti kih metoda se provodi radi osiguravanja kvalitete analiti kih rezultata, što je sastavni dio dobre analiti ke i proizvodne prakse te zadovoljavanja regulatornih zahtjeva i standarda vezanog za akreditaciju laboratorija [108].

U svrhu osiguranja kvalitete rezultata, brojne međunarodne organizacije izdaju vodiče za validaciju analiti kih metoda [107,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124], a objavljeno je i nekoliko preglednih radova na tu temu [125,126,127,128,129,130]. Među vodičima postoje razlike pa je prikladnost analiti ke metode djelomično ovisna o odabranom vodiču, terminologiji i metodologiji koja se u njemu koristi [104,105,131] te postojanje brojnih vodiča može zbuniti analitičare, što može rezultirati izbjegavanjem validacije metode. Zato je potrebno osigurati jedinstvene definicije pojedinih parametara, kriterija prihvatljivosti, metodologije i statističkih analiza koje su u skladu s definicijom i predmetom validacije te svakom analitičkom metodom [104]. Usprkos tome što

ih je mnogo, malo je jasnih metodoloških vodiča [132,133,134,135] koji govore o praktičnom aspektu oblikovanja validacijskih eksperimenata te koji pomažu analitičaru utvrditi valjanost metode [106,136,137,138].

Potpuna validacija provodi se kod razvoja i uvođenja nove metode ili njene prenamjene [118]. Revalidacija se provodi kod prijenosa metode između laboratorija, promjene analitičara, uređaja, kemikalija, sastava konanog proizvoda, matriksa te promjene u analitičkom postupku [104,113,118]. Potrebna je i ako se tijekom svake analize prikladni rezultati dobivaju tek ponovljenim prilagodbama operativnih parametara analitičkog postupka [119]. Njome se dokazuje da se karakteristike analitičkog postupka nisu promijenile tijekom vremena ili uslijed nastalih promjena te da se dobivaju pouzdani i kvalitetni podaci [119]. Opseg i stupanj revalidacije ovise o prirodi prisutnih promjena, a u nekim slučajevima to može značiti i ponovnu potpunu validaciju [104,113,118]. Unakrsna validacija (eng. *cross-validation*) je usporedba parametara validacije pri korištenju dvije ili više metoda za dobivanje podataka u istoj ili različitim studijama [118].

Uinkovitost metode dokazuje se eksperimentima u kojima se koriste uzorci ili standardi slični uzorcima za koju je analizu metoda namijenjena. S obzirom da su razvoj i validacija metode dugotrajni i skupi procesi, pažljivo planiranje eksperimenata pomaže u svođenju njihovog broja na najmanju moguću razinu [104]. Opširniji validacijski eksperimenti potrebni su kada se metodu namjerava koristiti rutinski [106]. Njihova provedba obično slijedi validacijski protokol napisan u obliku koraka [104], a svi eksperimenti provedeni u svrhu određivanja validacijskih parametara i donošenja zaključaka o valjanosti metode iskazuju se u izvještaju o validaciji [118].

1.3.1. Parametri validacije

Parametri koje je potrebno odrediti pri validaciji ovise o vrsti i namjeni metode [113]. U nastavku su definirani i opisani sljedeći parametri: selektivnost/specifičnost, linearnost, područje, preciznost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije i stabilnost.

Selektivnost/specifičnost

Selektivnost je sposobnost metode za određivanje pojedinog analita u kompleksnom uzorku bez interferencije drugih sastojaka uzorka [139,140], odnosno selektivna je metoda kojom se istovremeno određuje više komponenti u uzorku bez obzira razlikuju li se te komponente međusobno ili ne.

Specifičnost je sposobnost jasnog određivanja jednog analita u prisutnosti drugih otkivanih sastojaka uzorka [113,140] i ona zahtjeva 100 %-tnu selektivnost [128,135]. Određivanje specifičnosti uključuje ispitivanje mogućnosti identificiranja analita, ispitivanje isto ime se utvrđuje prisutnost interferencija i ispitivanje sposobnosti određivanja sadržaja analita u uzorku [113]. Kod kvantitativnih metoda su prihvatljive male interferencije, ako su pri granici kvantifikacije zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za točnost i preciznost [107,109, 125,126,128].

Linearnost

Linearnost je pojam koji opisuje direktnu proporcionalnost dobivenih rezultata i koncentracije (količine) analita u uzorku unutar definiranog područja metode. Određuje se na minimalno pet koncentracijskih razina u rasponu od 80 do 120 % od otkivane koncentracije analita u uzorku uz minimalno tri ponavljanja [104]. Nakon mjerenja potrebno je pronaći matematički model koji adekvatno opisuje odnos koncentracije analita i signala. Izbor

prikladnog kalibracijskog modela nužan je za pouzdanu kvantifikaciju, a preporuča se upotreba linearnih modela [106]. Kao dokaz linearnosti potrebno je iskazati koeficijent korelacije (CV; relativna standardna devijacija – RSD), odsjeka na y-osi, nagib regresijskog pravca i zbroj kvadrata odstupanja te priložiti grafički prikaz. Kako bi kriterij prihvatljivosti bio zadovoljen, koeficijent korelacije mora biti veći od 0,999 [105]. Kod metoda kod kojih ne postoji linearan odnos, ovisnost signala o koncentraciji analita opisuje se prikladnom funkcijom [113].

Područje

Područje metode se može definirati kao interval između najniže i najviše koncentracije (količina) analita u uzorku pri kojem se mjerenju dobivaju rezultati prihvatljive preciznosti, točnosti i linearnosti. Razlikuje se ovisno o namijenjenoj primjeni metode te postoji preporučeno minimalno specifično područje koje najčešće obuhvaća koncentracijski raspon od 80 do 120 % od ekvivalentne koncentracije analita. Može se odrediti iz podataka dobivenih utvrđivanjem linearnosti [113].

Preciznost

Preciznost analitičke metode opisuje slaganje (stupanj rasipanja) rezultata ponovljenih mjerenja na homogenom uzorku pod određenim uvjetima [113,140].

Postoje tri tipa preciznosti: repetibilnost, intermedijarna preciznost i reproducibilnost te se svaki od njih posebno određuje [113]. Repetibilnost (ponovljivost) označava preciznost pod istim uvjetima mjerenja u kratkom vremenskom periodu [113,140]. Intermedijarna preciznost (unutarlaboratorijska obnovljivost) označava preciznost unutar jednog laboratorija uz moguću varijaciju kao što su različiti dani analize, analitičar, oprema itd. Cilj je utvrditi

hoće li rezultati biti isti, unatoč promjenama unutar laboratorija [113]. Reproducibilnost (obnovljivost) označava preciznost izmeću laboratorija, tj. sposobnost metode da daje iste rezultate u različitim laboratorijima [113,140] i potrebno ju je ispitati jedino ako je korištenje metode za to predviđeno [106].

Preciznost se određuje s najmanje devet mjerenja (npr. na tri koncentracijske razine u tri ponavljanja) u definiranom području metode ili s najmanje šest mjerenja na najvišoj koncentracijskoj razini. Poželjno je njeno određivanje na homogenim, autentičnim uzorcima, a ako to nije moguće onda se primjenjuju oni umjetno pripremljeni. Statistički parametri koji se koriste za dokazivanje preciznosti su standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija i interval pouzdanosti rezultata niza ponovljenih mjerenja [113]. U Tablici 2. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za repetibilnost ovisno o udjelu analita u uzorku [140].

Točnost

Točnost predstavlja blizinu slaganja vrijednosti dobivenih mjerenjem s prihvaćenom stvarnom ili referentnom vrijednosti [113,140]. Budući da utvrđivanje točnosti omogućuje određivanje sistematske pogreške metode [140], smatra se najvažnijim parametrom validacije [141]. Treba biti određena u cijelom području metode nakon određivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti, na minimalno tri koncentracijske razine u minimalno tri ponavljanja mjerenja. Iskazuje se kao postotak iskorištenja dobiven mjerenjem poznate dodane količine analita ili kao razlika između stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti i one dobivene mjerenjem, uz definiran interval pouzdanosti [113]. U Tablici 2. nalaze se kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje ovisno o udjelu analita u uzorku [140].

Tablica 2. Kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i repetibilnost ovisno o udjelu analita u uzorku [140]

Analit (%)	Omjer analita	Srednja vrijednost iskorištenja (%)	RSD za preciznost (%)
100	1	98 – 102	1,3
10	10^{-1}	98 – 102	1,9
1	10^{-2}	97 – 103	2,7
0,1	10^{-3}	95 – 105	3,7
0,01	10^{-4}	90 – 107	5,3
0,001	10^{-5}	80 – 110	7,3
0,0001	10^{-6}	80 – 110	11
0,00001	10^{-7}	80 – 110	15
0,000001	10^{-8}	60 – 115	21
0,0000001	10^{-9}	40 – 120	30

Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koju je moguće detektirati, no ne nužno i kvantificirati kao egzaktnu vrijednost [104,113,140]. To je točka u kojoj je izmjerena vrijednost veća od nesigurnosti koja je s njome povezana [104], tj. najniža koncentracija analita u uzorku koja se pouzdano može razlikovati od šuma [124].

Granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti uz prihvatljivu preciznost i točnost [113,140]. Predstavlja važan parametar za kvantitativne analize kod kojih je niska koncentracija analita u uzorku i najviše se koristi za utvrđivanje postojanja nestabilnih i/ili razgradnih produkata [104,113]. Stoga je pri

njenom odreivanju potrebno koristiti iste standarde i matrikse sli ne stvarnom uzorku [104]. Kvantitativno izražavanje rezultata ispod granice kvantifikacije nije prihvatljivo [124].

Za odreivanje granice detekcije i kvantifikacije se koriste različiti pristupi [104,105]. Vizualna kontrola uključuje pripremu uzoraka poznate koncentracije analita i utvrivanje koncentracije pri kojoj analit može biti pouzdano detektiran [113]. Najpopularniji pristup je odreivanje pomoću omjera signala i šuma [105], uz prihvatljivu preciznost i točnost [104] kod kojeg se uspoređuje signal dobiven mjerenjem pri niskim koncentracijama analita sa signalom dobivenim mjerenjem slijepe probe, tj. šumom. Minimalan prihvatljiv omjer signala i šuma je 3:1 kod granice detekcije te 10:1 kod granice kvantifikacije [104,105]. Kod odreivanja granica detekcije i kvantifikacije pomoću omjera standardne devijacije odziva detektora i nagiba kalibracijske krivulje, minimalan prihvatljiv omjer je 3:1 kod granice detekcije i 10:1 kod granice kvantifikacije [104,106]. Standardna devijacija (SD) kalibracijske krivulje može se odrediti na temelju SD slijepe probe, razlike SD regresijskog pravca ili SD odsjeka na y-osi regresijskog pravca [105,113].

Robusnost

Robusnost je mjera osjetljivosti metode na male, namjerne promjene parametara koja ukazuje na njenu pouzdanost tijekom uobičajene primjene [113]. To uključuje promjenu protoka, temperature kolone i sastav mobilne faze kod tekućinske kromatografije te drugih parametara svojstvenih metodi [104,113]. Utvrivanje robusnosti metode preporučeno je provesti tijekom razvoja metode kako se neukovitost ne bi ušla rutinskom kontrolom kvalitete i zakomplicirala proces validacije [104]. Ako je analitički postupak osjetljiv na promjene parametara analize, oni se moraju adekvatno kontrolirati ili se u postupak trebaju uključiti mjere predostrožnosti. Posljedica utvrivanja robusnosti trebala bi biti prikladnost

niza parametara metode koji osiguravaju njezinu uinkovitost [113]. Određivanje robusnosti neophodno je kod prijenosa metode izmeđ u laboratorija [142]. Podaci o robusnosti pomažu pri određivanju potrebe za revalidacijom metode, ukoliko dolazi do promjene jednog ili više parametara [113].

Važan imbenik koji utječe na robusnost metode je stabilnost ispitnih otopina. Stabilnost se definira kao kemijska stabilnost analita u danom matriksu pod specifičnim uvjetima u određenom vremenskom intervalu i neophodna je za dobivanje pouzdanih podataka [106]. Kako bi se uočila degradabilnost analita i standarda, potrebno je utvrditi njihovu stabilnost pod utjecajem različitih vanjskih uvjeta (temperatura, svjetlost, vlažnost), tijekom procesa sakupljanja i rukovanja uzorkom, nakon dugotrajnog ili kratkotrajnog skladištenja te pripreme uzorka za analizu [104,118]. Osim ako su podaci o stabilnosti analita dostupni u literaturi, potpuna validacija metode mora uključivati ispitivanje stabilnosti [106].

1.3.2. Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost nije validacijski parametar, no može se odrediti iz podataka o validaciji metode (iz rezultata dobivenih određivanjem točnosti i preciznosti) [143] ili podataka prikupljenih rutinskom kontrolom kvalitete [110]. Predstavlja statistički parametar, standardnu devijaciju ili širinu intervala pouzdanosti, koji opisuje raspršenost vrijednosti dobivenih mjerenjem, a koje se mogu razumno pripisati mjerenoj veličini [111]. Može se definirati i kao interval u kojem se prava vrijednost rezultata mjerenja nalazi s određenom vjerojatnošću u [104]. Određuje se radi prosvjerenja adekvatnosti rezultata za namijenjenu svrhu i dokazivanja njihove dosljednosti u usporedbi sa sličnim rezultatima [105]. Objavljeni su standardi i vodiči [110,144,145,146,147] koji pomažu pri određivanju i iskazivanju mjerne nesigurnosti, no ona se unatoč svojoj važnosti rijetko određuje [104].

2. OP I I SPECIFI NI CILJEVI RADA

Ugljikohidrati predstavljaju važan izvor energije u prehrani dojenadi. Bitna su komponenta hrane za dojenad te se javlja potreba za uinkovitom analitičkom metodom za određivanje njihovog sastava i udjela u spomenutoj hrani. Ciljevi ovog rada bili su razvoj i validacija jednostavne i brze metode za određivanje udjela ugljikohidrata (fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze) u uzorcima hrane za dojenad. U svrhu validacije metode, kako bi se dokazala njena prikladnost za namijenjenu primjenu, cilj je bio utvrditi je li metoda selektivna pri određivanju pojedinog analita u kompleksnom uzorku bez interferencije drugih sastojaka uzorka; postoji li linearan odnos dobivenih rezultata i koncentracije (količine) analita u uzorku unutar definiranog područja metode; postiže li se prihvatljiva preciznost metode pri ponovljenom mjerenju na homogenom uzorku pod istim uvjetima, u kratkom vremenskom periodu; postiže li se zadovoljavajuća blizina slaganja vrijednosti dobivenih mjerenjem i stvarnih vrijednosti, odnosno točnost metode te odrediti granicu detekcije i granicu kvantifikacije pojedinog analita kako bi se utvrdila osjetljivost metode pri njihovom određivanju. Također, cilj je bio i određivanje udjela fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze u hrani za dojenad odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta i pri isteku roka valjanosti, kako bi se ispitale moguće promjene sastava i udjela ugljikohidrata uslijed skladištenja.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uređaji i oprema

Analitička vaga (YMC Chyo, tip JK-180)

Ultrazvučna kupelj (VWR Ultrasonic cleaner, model USC 300T)

Visoko djelotvorni tekućinski kromatograf

Sustav kontroler (SHIMADZU SCL-10A_{VP})

Detektor indeksa loma – RI detektor (SHIMADZU RID-10A)

Termostat za kolonu (SHIMADZU CTO-10AS_{VP})

Pumpa (SHIMADZU LC-10AD_{VP})

Linijski vakuum degazer (SHIMADZU DGV-14A)

Predkolona (Shodex Asahipak NH₂50G-4A)

Kolona (Shodex Asahipak NH₂P50-4E; 4,6·250 mm, 5 μm)

Filteri: Filtrak 21N filter papir

MN 640 d filter

SUPELCO 0,45 μm x 47 mm filter

Cameo syringe 0,45 μm filter

Mikrolitarska šprica

3.1.2. Kemikalije i standardi

Acetonitril (J.T. Baker), HPLC-gradient grade

Redestilirana voda

Standardi (Fluka, Biochemica)

D-(-)-fruktoza, 99 % isto e (HPLC)

D-(±)-glukoza, bezvodna, 99,5 % isto e (HPLC)

Saharoza, 99,5 % isto e (HPLC)

D-(±)-laktoza monohidrat, 99,5 % isto e (HPLC)

3.1.3. Uzorci

Analizirano je 10 uzoraka prijelazne hrane za dojen ad i 1 uzorak hrane za malu djecu.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Razvoj i validacija metode

Razvijena je metoda za odre ivanje udjela ugljikohidrata (glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze) u hrani za dojen ad pomo u visoko djelotvorne teku inske kromatografije (HPLC) uz primjenu detektora indeksa loma. U svrhu validacije, ispitana je selektivnost, linearnost i podru je, preciznost, to nost metode, granica detekcije i granica kvantifikacije.

3.2.1.1. Selektivnost

Selektivnost metode utvr ena je usporedbom kromatograma mobilne faze, standarda i uzorka.

3.2.1.2. Linearnost i podru je

Linearnost metode odre ena je injektiranjem otopina za baždarenje. Prema navedenom analiti kom postupku napravljene su po tri odvage za pet koncentracijskih razina svakog pojedinog standarda u rasponu od 80 do 120 % od o ekivane koncentracije analita u uzorku u tri uzastopna ponavljanja. Izra unata je srednja vrijednost površina, zatim je odre ena

jednadžba regresijskog pravca, nagib, odsjeka te koeficijent korelacije. Područje je određeno iz podataka o linearnosti metode. Izraz unat je omjer površine pika i koncentracije analita te logaritama koncentracije analita.

3.2.1.3. Preciznost

Repetibilnost metode određena je višestrukim injektiranjem iste otopine standarda. Obrađeni su rezultati mjerenja na tri koncentracijske razine u tri ponavljanja. Izraz unata je srednja vrijednost i relativna standardna devijacija dobivenih površina pikova.

3.2.1.4. Točnost

Točnost metode ispitana je injektiranjem otopine uzorka u koju je dodana poznata količina standarda na pet koncentracijskih razina u tri ponavljanja unutar radnog područja metode. Iz dobivenih podataka linearnom regresijom je izraz unata srednja vrijednost koncentracije, iskorištenje i relativna standardna devijacija.

3.2.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije određene su metodom omjera signala i šuma pri čemu je kod granice detekcije omjer 3:1, a granice kvantifikacije 10:1.

3.2.2. Određivanje udjela ugljikohidrata u hrani za dojenčad i ispitivanje mogućih promjena uslijed skladištenja

Ispitivanje udjela ugljikohidrata u hrani za dojenčad provedeno je odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta i do isteka roka valjanosti, odnosno u vremenskom razmaku od 20 mjeseci, kako bi se utvrdilo dolazi li do promjene u sastavu i udjelu ispitivanih

ugljikohidrata. Hrana za dojen ad je u me uvremenu skladištena pri sobnoj temperaturi. Rok valjanosti je 24 mjeseca.

3.2.2.1. Priprema mobilne faze

U menzuru od 1000 mL se pomo u trbušaste pipete ulije 750 mL acetonitrila i 250 mL redestilirane vode. Otopina se profiltrira kroz 0,45 µm filter i zatim 25 minuta degazira u ultrazvu noj kupelji.

3.2.2.2. Priprema uzorka

Oko 2 g ± 0,0001 g uzorka se odvaže u odmjernu tikvicu od 50 mL, koja se zatim nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otopljeni uzorak se profiltrira preko 4 filtera (redoslijedom kojim su opisani pod opremom). Uzorak se u ure aj unosi mikrolitarskom injekcijom.

3.2.2.3. Uvjeti rada

Mobilna faza:	Acetonitril : voda = 3 :1
Protok mobilne faze:	Izokratni mod
Brzina protoka mobilne faze:	1 mL/min
Volumen injektiranog uzorka:	20 µL
Temperatura kolone:	30°C
Vrijeme eluiranja:	30 min

3.2.3. Analiza podataka

Podaci dobiveni mjerenjem obra eni su pomo u ra unalnog programa LC Postun Analysis (verzija 1,22 SP1, Shimadzu corporation).

Analiza korištena za utvrđivanje postoji li statistički značajna razlika u udjelu ugljikohidrata nakon skladištenja je ANOVA, uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$. Statistička značajnost razlike utvrđena je za svaki pojedini ugljikohidrat u svakom od ispitivanih uzoraka.

4. REZULTATI

Na slikama 1., 2. i 3. prikazani su kromatogrami mobilne faze, standarda i uzorka.

U tablicama 3., 5., 7. i 9. nalaze se rezultati ispitivanja linearnosti za fruktozu, glukozu, saharozu i laktozu. Na slikama 4., 6., 8. i 10. nalaze se grafi ki prikazi ovisnosti površine pika o koncentraciji fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze. U tablicama 4., 6., 8. i 10. nalaze se rezultati ispitivanja podru ja linearnosti za fruktozu, glukozu, saharozu i laktozu. Na slikama 5., 7., 9. i 11. nalaze se grafi ki prikazi podru ja linearnosti za fruktozu, glukozu, saharozu i laktozu.

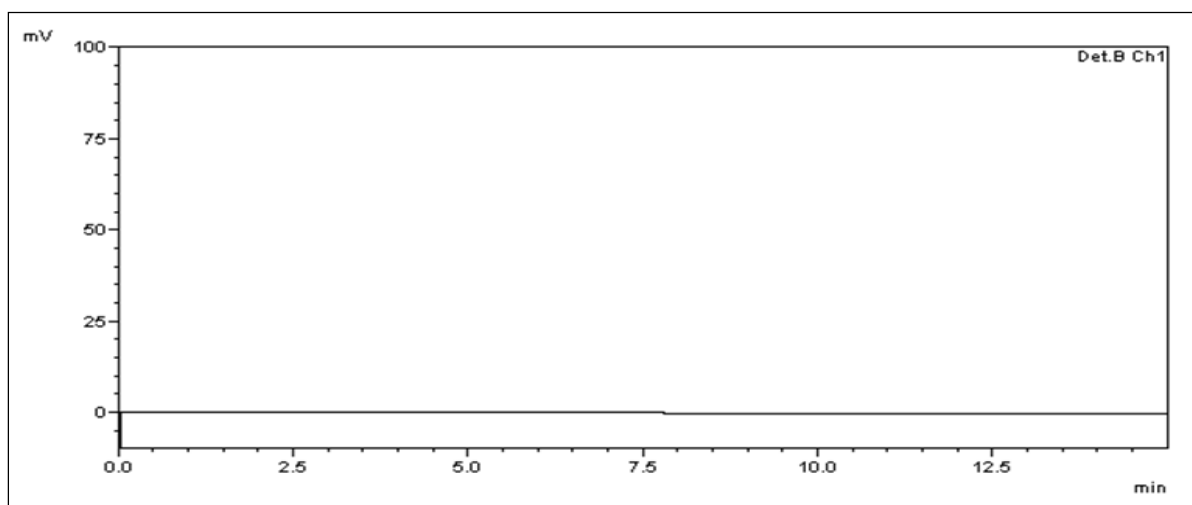
U Tablici 11. nalaze se rezultati ispitivanja repetibilnosti mjerenja.

U tablicama 12., 13., 14. i 15. nalaze se podaci o to nosti metode pri odre ivanju fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze. Na slikama 12., 13., 14. i 15. nalaze se grafi ki prikazi podataka za to nost metode pri odre ivanju fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze.

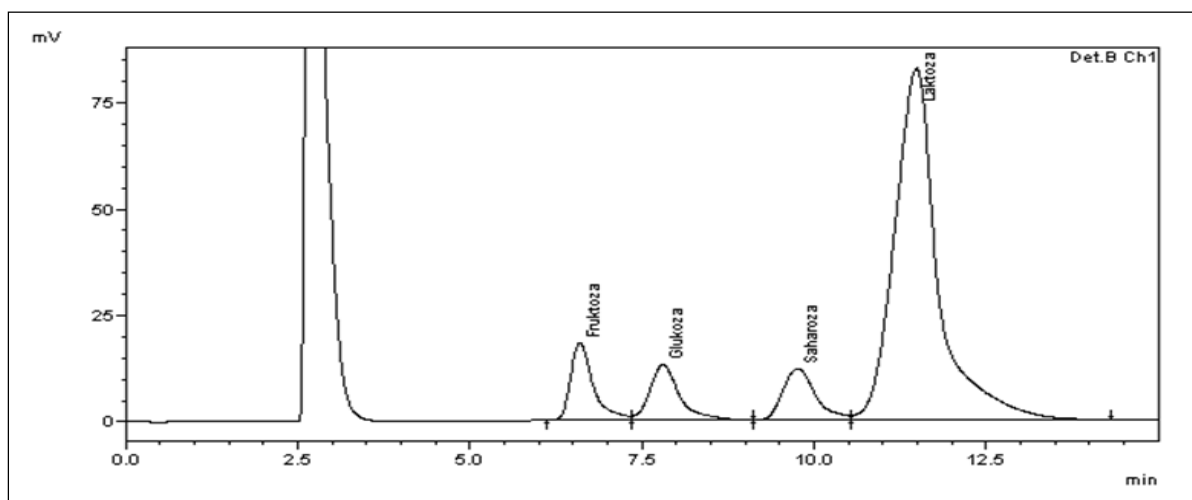
U Tablici 16. nalaze se rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije.

Od Tablice 17. do Tablice 27. nalaze se rezultati odre ivanja ugljikohidrata u hrani za dojen ad. Na slikama 16., 17., 18. i 19. nalaze se grafi ki prikazi postotka razlike udjela fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze dobivenog mjerenjem pri isteku roka valjanosti, u odnosu na mjerenje odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta.

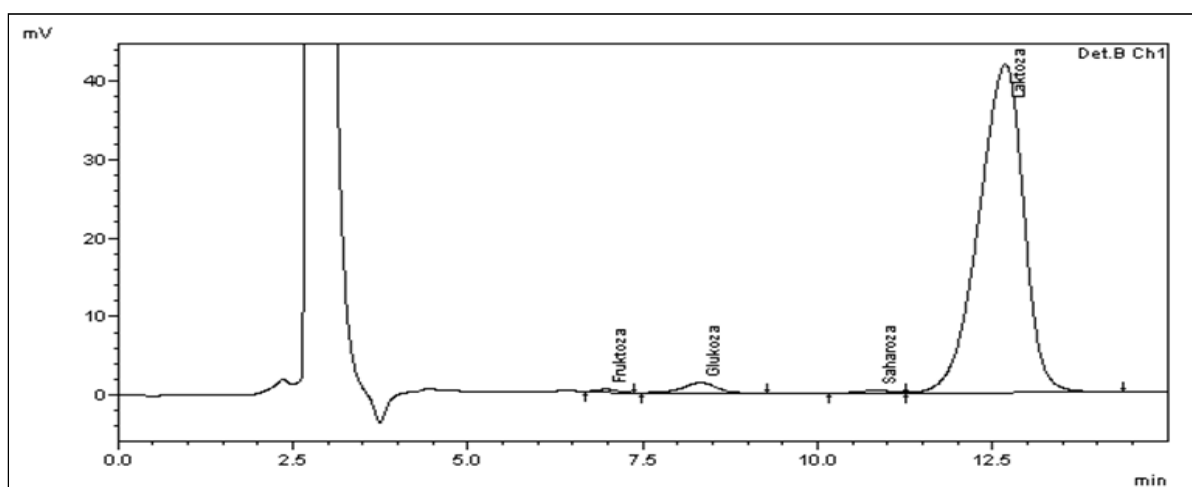
4.1. SELEKTIVNOST



Slika 1. Kromatogram mobilne faze



Slika 2. Kromatogram otopine standarda

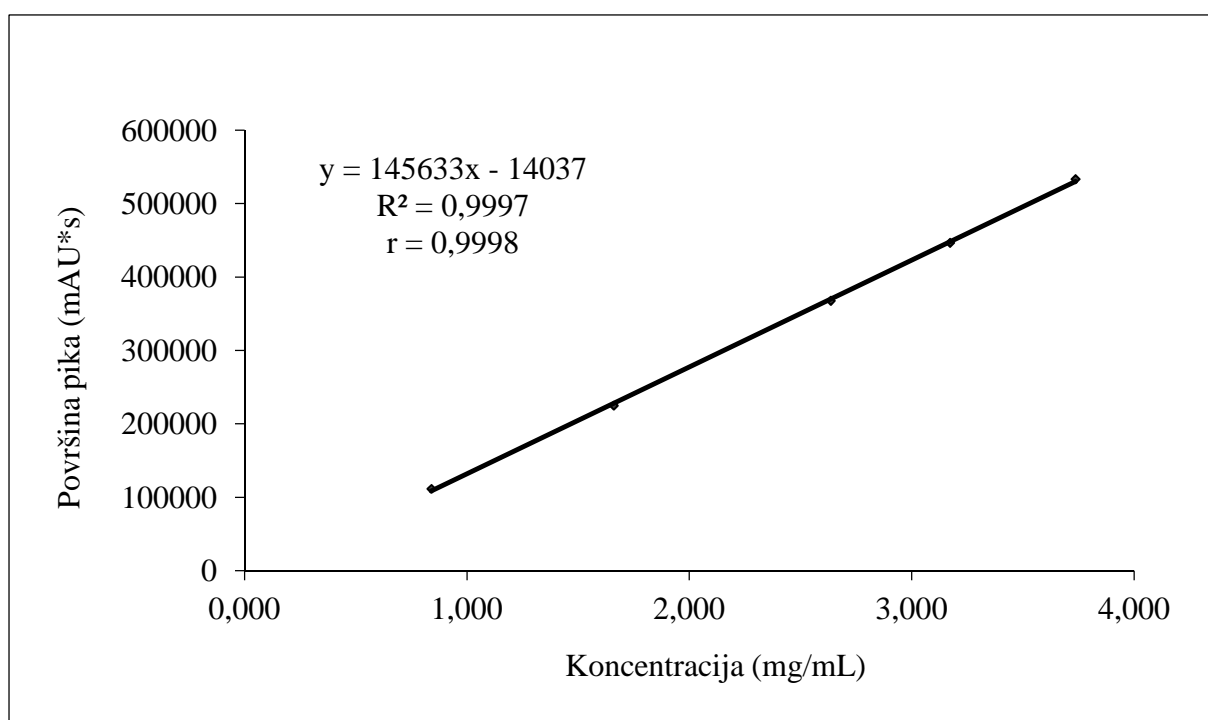


Slika 3. Kromatogram otopine uzorka

4.2. LINEARNOST I PODRUJE

Tablica 3. Rezultati ispitivanja linearnosti za fruktozu

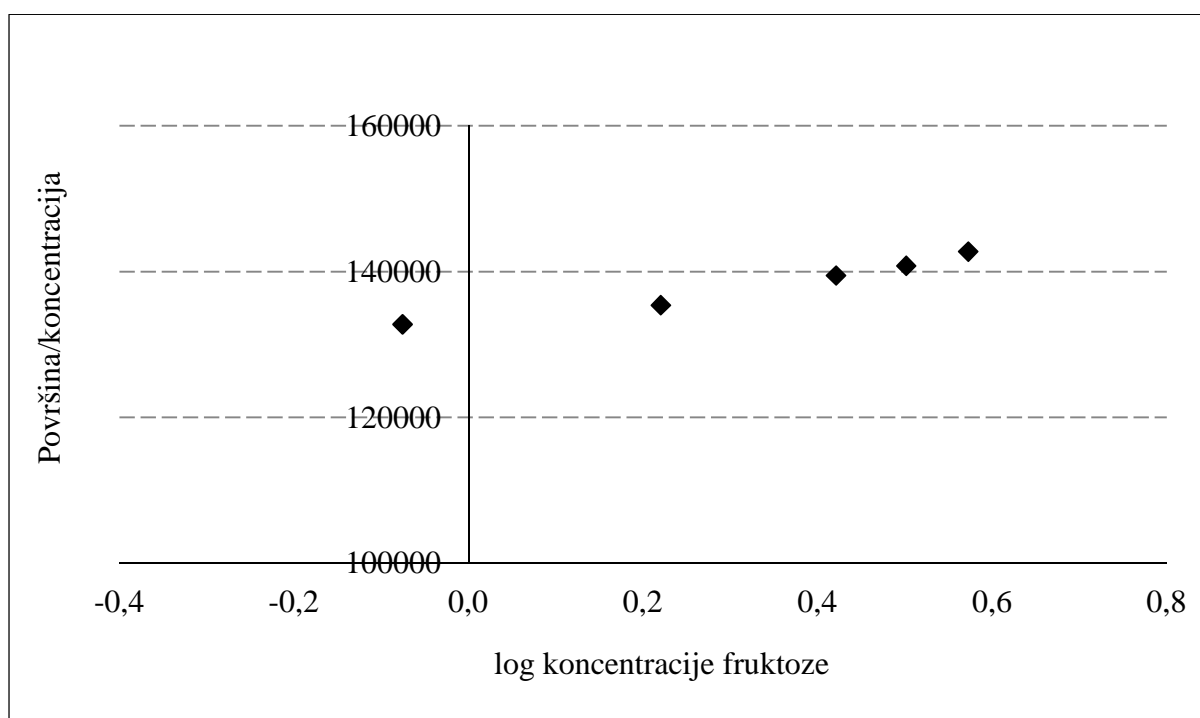
Koncentracija (mg/mL)	Srednja vrijednost površine (eksp.) (mAU*s)	Površina (teor.) (mAU*s)
0,840	111521	108295
1,660	224747	227714
2,636	367634	369852
3,172	446596	447911
3,736	533324	530048



Slika 4. Grafi ki prikaz ovisnosti površine pika o koncentraciji fruktoze

Tablica 4. Rezultati ispitivanja područja linearnosti za fruktozu

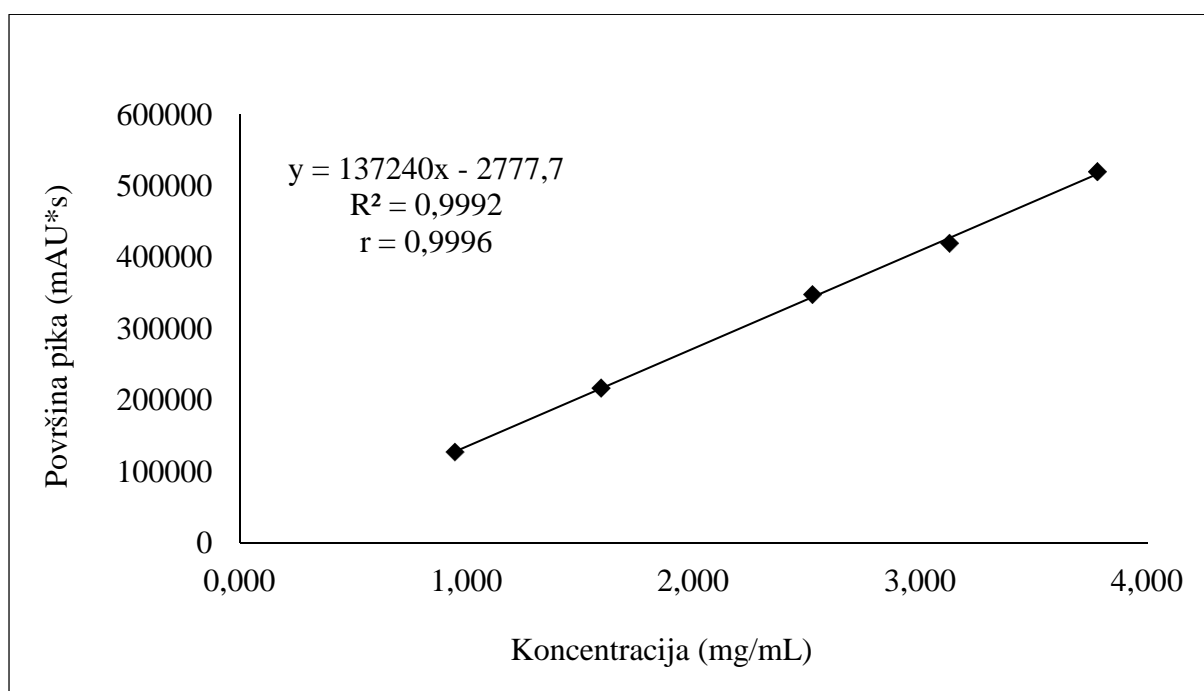
Koncentracija (mg/mL)	Površina (mAU*s)	Površina/ koncentracija	Log koncentracije
0,840	111521	132763	-0,075721
1,660	224747	135390	0,220108
2,636	367634	139467	0,420945
3,172	446596	140793	0,501333
3,736	533324	142753	0,572407



Slika 5. Grafi ki prikaz područja linearnosti za fruktozu

Tablica 5. Rezultati ispitivanja linearnosti za glukozu

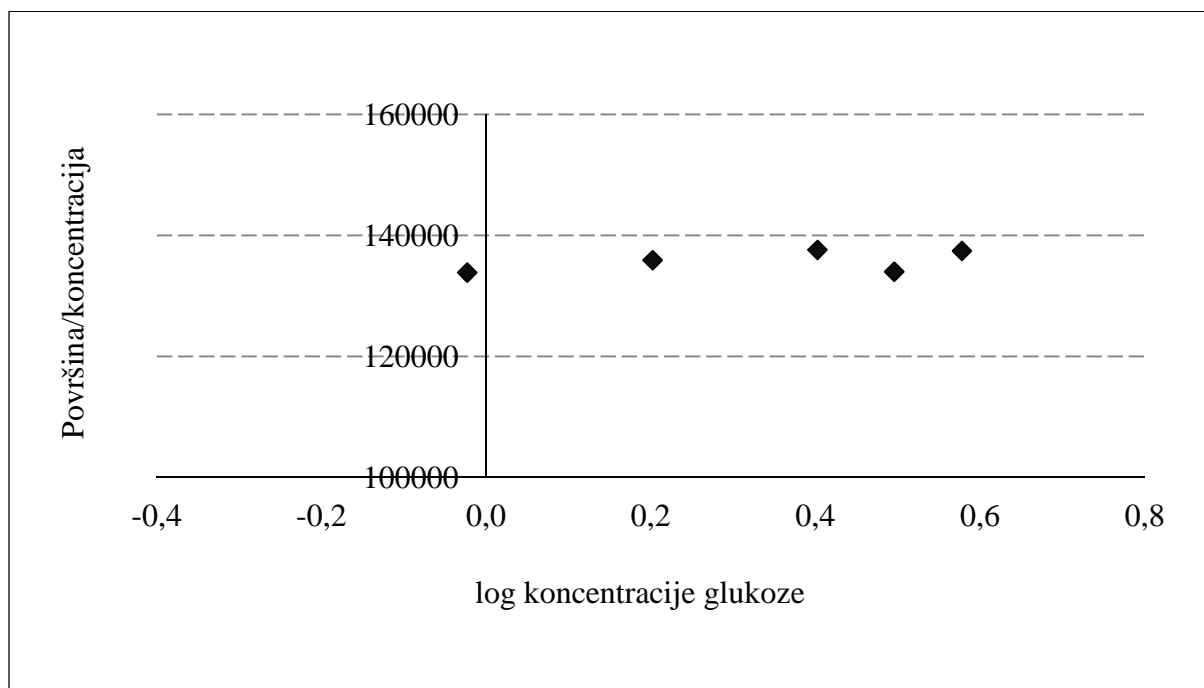
Koncentracija (mg/mL)	Srednja vrijednost površine (eksp.) (mAU*s)	Površina (teor.) (mAU*s)
0,948	126891	127326
1,592	216339	215708
2,524	347321	343616
3,128	419149	426509
3,780	519452	515990



Slika 6. Grafi ki prikaz ovisnosti površine pika o koncentraciji glukoze

Tablica 6. Rezultati ispitivanja podru ja linearnosti za glukozu

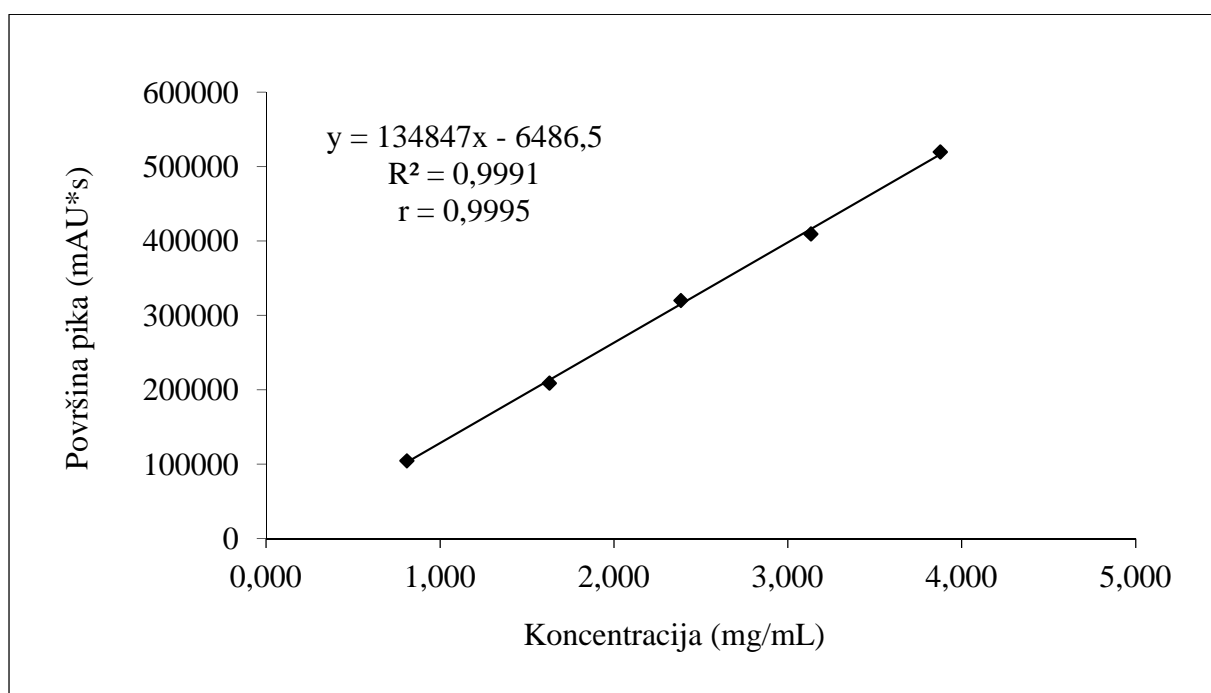
Koncentracija (mg/mL)	Površina (mAU*s)	Površina/ koncentracija	Log koncentracije
0,948	126891	133851	-0,023192
1,592	216339	135891	0,201943
2,524	347321	137607	0,402089
3,128	419149	133999	0,495267
3,780	519452	137421	0,577492



Slika 7. Grafi ki prikaz podru ja linearnosti za glukozu

Tablica 7. Rezultati ispitivanja linearnosti za saharozu

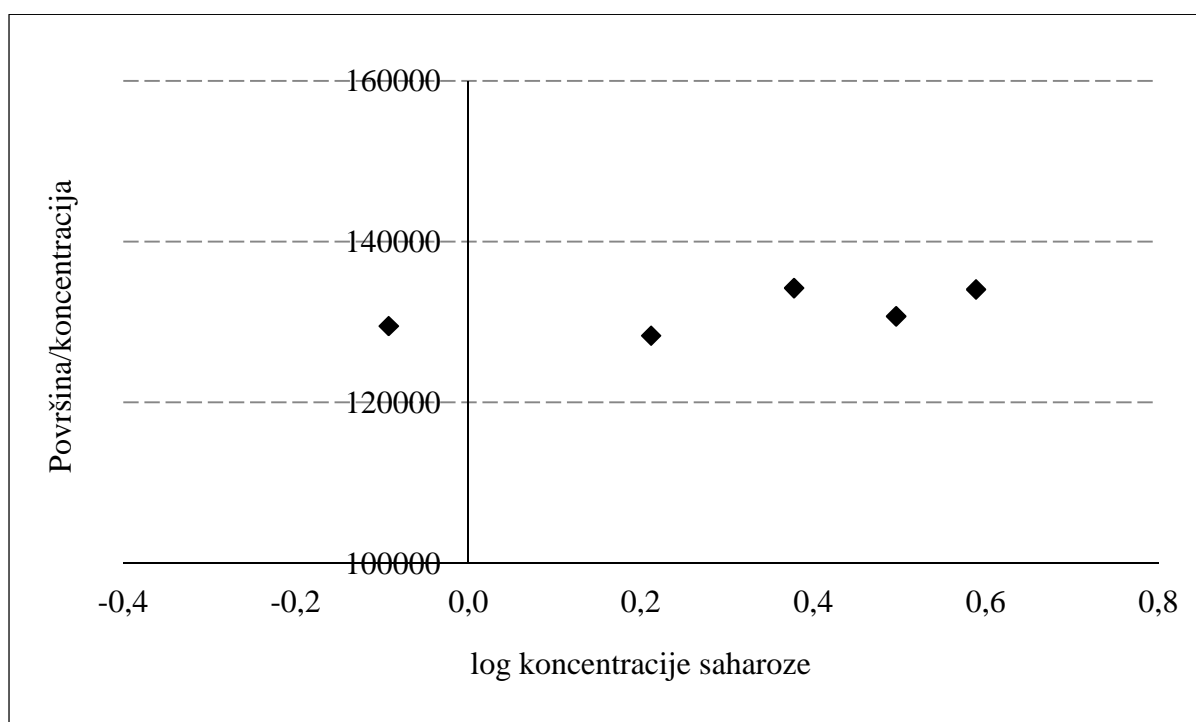
Koncentracija (mg/mL)	Srednja vrijednost površine (eksp.) (mAU*s)	Površina (teor.) (mAU*s)
0,808	104642	102470
1,628	208883	213044
2,384	320003	314989
3,132	409413	415854
3,876	519595	516180



Slika 8. Grafi ki prikaz ovisnosti površine pika o koncentraciji saharoze

Tablica 8. Rezultati ispitivanja podru ja linearnosti za saharozu

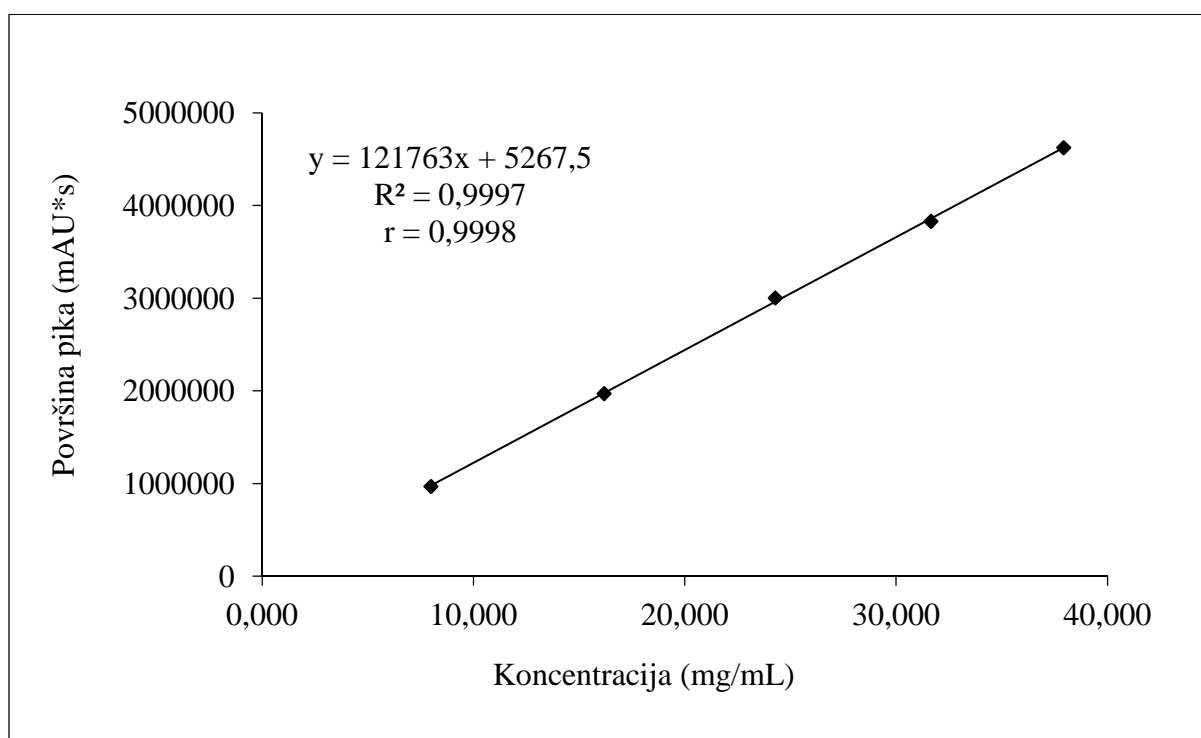
Koncentracija (mg/mL)	Površina (mAU*s)	Površina/ koncentracija	Log koncentracije
0,808	104642	129507	-0,092589
1,628	208883	128307	0,211654
2,384	320003	134229	0,377306
3,132	409413	130719	0,495822
3,876	519595	134054	0,588384



Slika 9. Grafi ki prikaz podru ja linearnosti za saharozu

Tablica 9. Rezultati ispitivanja linearnosti za laktozu

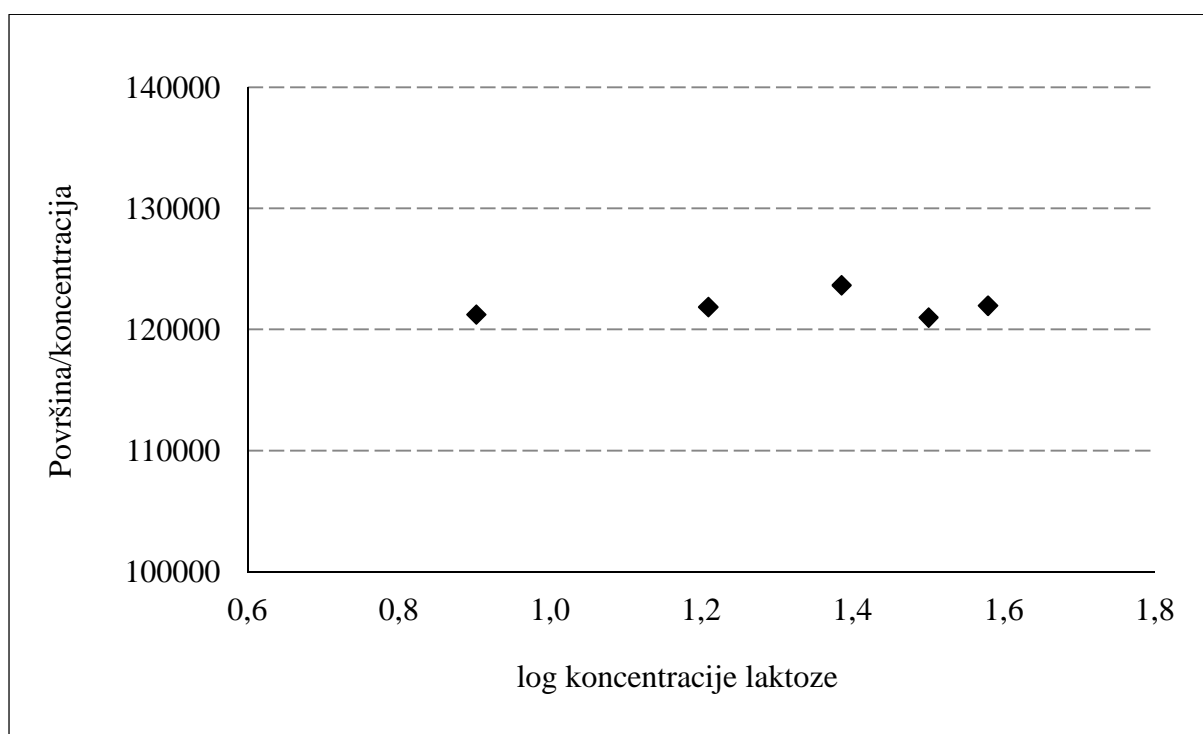
Koncentracija (mg/mL)	Srednja vrijednost površine (eksp.) (mAU*s)	Površina (teor.) (mAU*s)
7,984	967924	977423
16,180	1971576	1975393
24,280	3002258	2961673
31,644	3828574	3858336
37,920	4624955	4622520



Slika 10. Grafi ki prikaz ovisnosti površine pika o koncentraciji laktoze

Tablica 10. Rezultati ispitivanja podru ja linearnosti za laktozu

Koncentracija (mg/mL)	Površina (mAU*s)	Površina/ koncentracija	Log koncentracije
7,984	967924	121233	0,902221
16,180	1971576	121853	1,208979
24,280	3002258	123651	1,385249
31,644	3828574	120989	1,500291
37,920	4624955	121966	1,578868



Slika 11. Grafi ki prikaz podru ja linearnosti za laktozu

4.3. PRECIZNOST

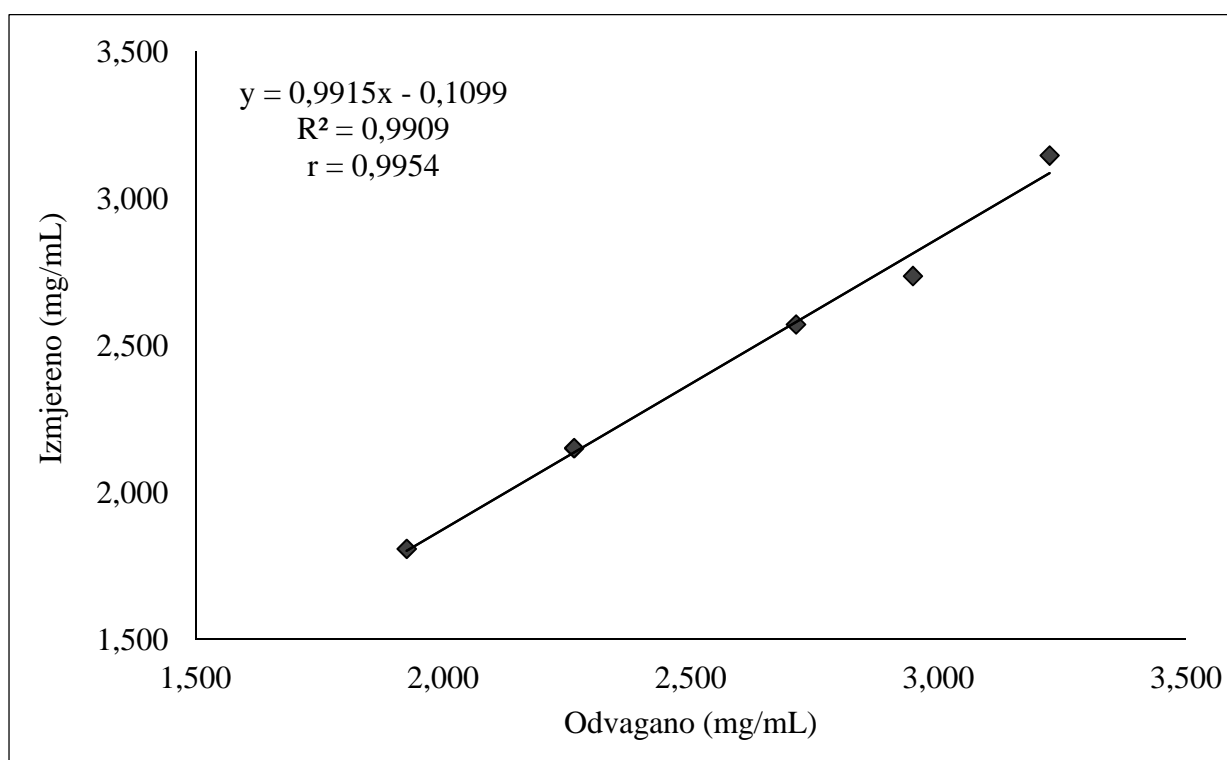
Tablica 11. Rezultati ispitivanja repetibilnosti mjerenja

Ugljikohidrat	Retencijsko vrijeme (min)		Površina pika (mAU*s)	
	Srednja vrijednost	RSD (%)	Srednja vrijednost	RSD (%)
Fruktoza	6,381	0,05	110777	0,68
	6,372	0,03	224145	0,13
	6,481	0,06	430045	0,80
Glukoza	7,461	0,04	126891	0,42
	7,451	0,03	217544	0,73
	7,622	0,05	415317	0,64
Saharoza	9,139	0,06	209577	0,39
	9,130	0,06	320003	0,64
	9,442	0,05	409413	0,06
Laktoza	10,569	0,11	967924	0,28
	10,569	0,05	3002258	0,50
	10,550	0,09	4649599	0,46

4.4. TO NOST

Tablica 12. To nost metode pri odre ivanju fruktoze

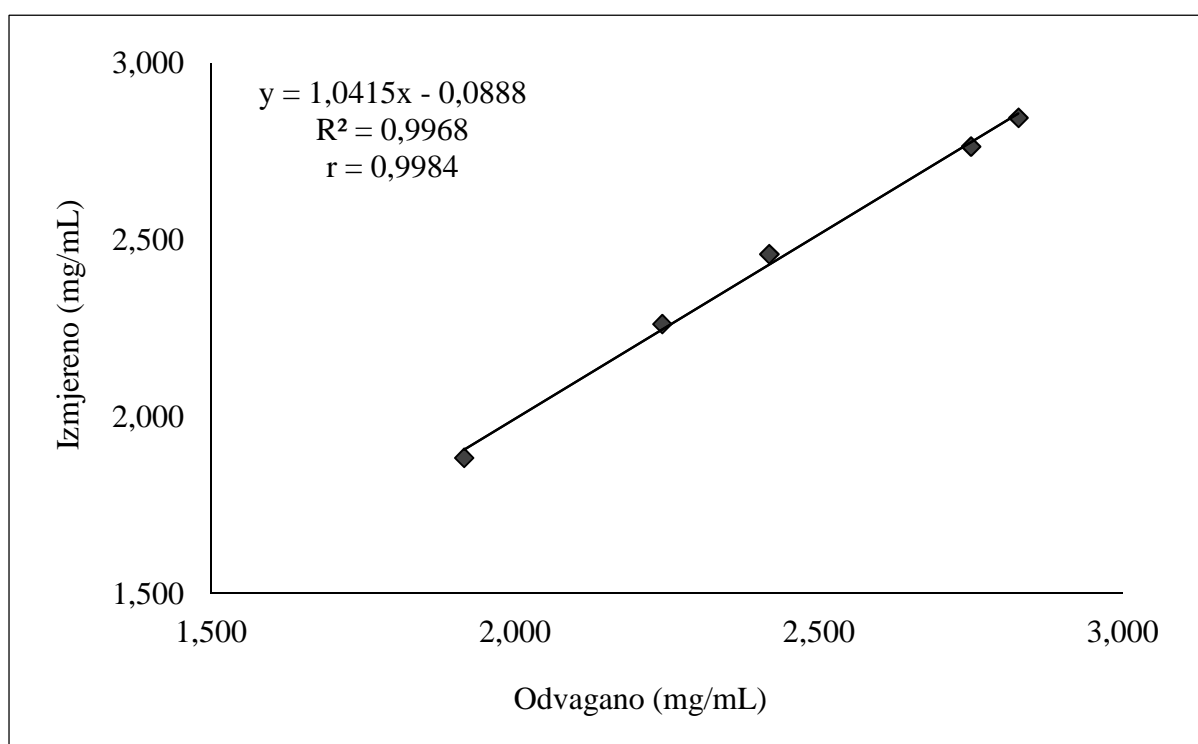
Odvagano (mg/mL)	Izmjereno (mg/mL)	Iskorištenje (%)
1,926	1,807	93,84
2,264	2,150	94,98
2,712	2,572	94,83
2,948	2,737	92,83
3,224	3,147	97,62
Srednja vrijednost		94,82
RSD (%)		1,89



Slika 12. Grafi ki prikaz podataka za to nost metode pri odre ivanju fruktoze

Tablica 13. Točnost metode pri određivanju glukoze

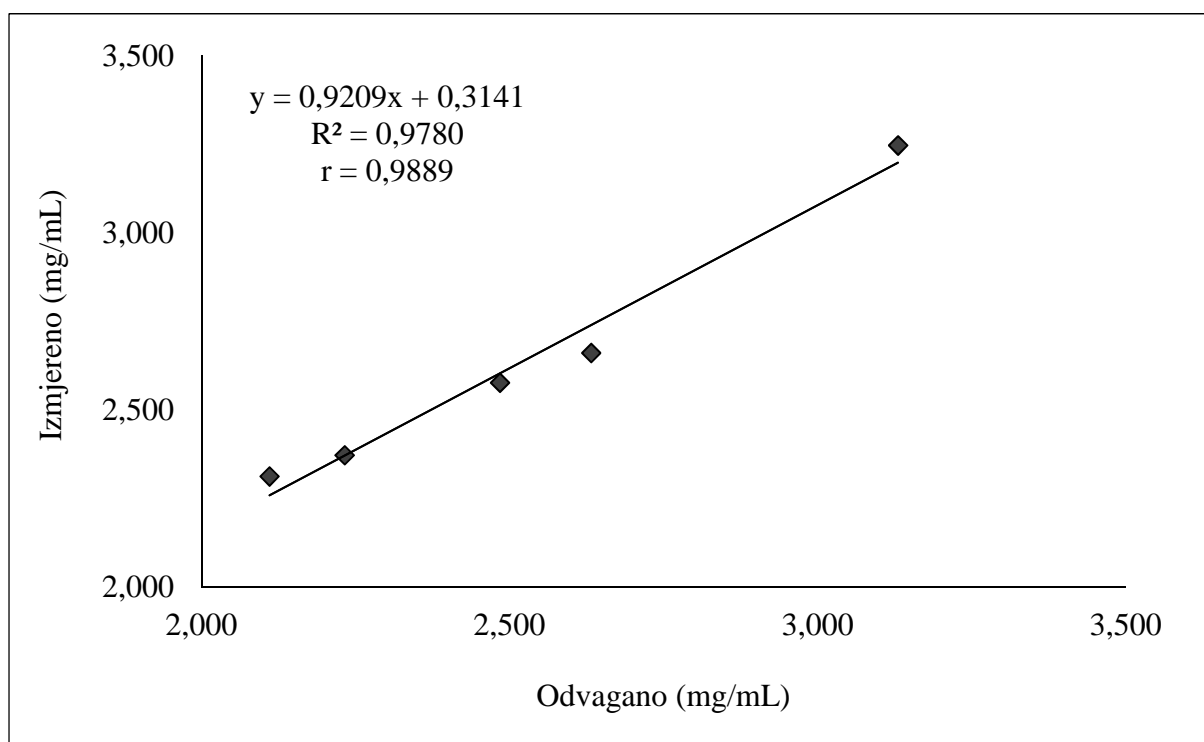
Odvagano (mg/mL)	Izmjereno (mg/mL)	Iskorištenje (%)
1,916	1,884	98,33
2,242	2,262	100,90
2,418	2,459	101,72
2,750	2,764	100,49
2,828	2,845	100,60
Srednja vrijednost		100,41
RSD (%)		1,25



Slika 13. Grafički prikaz podataka za točnost metode pri određivanju glukoze

Tablica 14. To nost metode pri odre ivanju saharoze

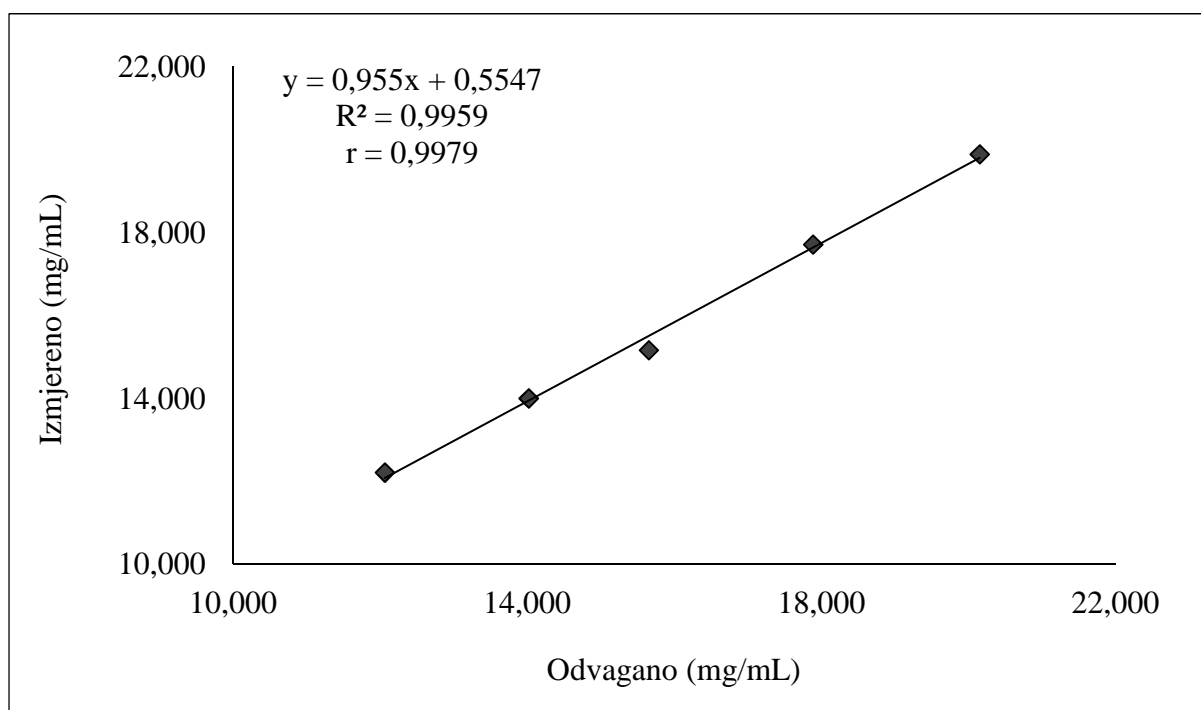
Odvagano (mg/mL)	Izmjereno (mg/mL)	Iskorištenje (%)
2,110	2,311	109,53
2,232	2,371	106,22
2,484	2,576	103,69
2,632	2,660	101,05
3,130	3,246	103,71
Srednja vrijednost		104,84
RSD (%)		3,05



Slika 14. Grafi ki prikaz podataka za to nost metode pri odre ivanju saharoze

Tablica 15. Točnost metode pri određivanju laktoze

Odvagano (mg/mL)	Izmjereno (mg/mL)	Iskorištenje (%)
12,060	12,203	101,19
14,016	13,991	99,82
15,650	15,156	96,84
17,884	17,705	99,00
20,150	19,885	98,68
Srednja vrijednost		99,11
RSD (%)		1,61



Slika 15. Grafički prikaz podataka za točnost metode pri određivanju laktoze

4.5. GRANICA DETEKCIJE I GRANICA KVANTIFIKACIJE

Tablica 16. Rezultati ispitivanja granice detekcije i granice kvantifikacije

Ugljikohidrat	Granica detekcije (mg/mL)	Granica kvantifikacije (mg/mL)
Fruktoza	0,020	0,068
Glukoza	0,029	0,095
Saharoza	0,035	0,117
Laktoza	0,060	0,201

4.6. ODRE IVANJE UDJELA UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJEN AD I ISPITIVANJE MOGU IH PROMJENA USLIJED SKLADIŠTENJA

Tablica 17. Rezultati odre ivanja ugljikohidrata u Uzorku 1

	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
Ugljikohidrat	Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)		Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)	
Fruktoza	0,425	0,289	0,380	0,258
	0,431	0,293	0,382	0,260
	0,411	0,280	0,375	0,255
Srednja vrijednost \pm SD	0,422 \pm 0,010	0,287 \pm 0,007	0,379 \pm 0,004	0,258 \pm 0,003
ANOVA (p-vrijednost)*	0,002			
Glukoza	2,544	1,731	3,122	2,124
	2,790	1,898	3,051	2,075
	2,717	1,848	3,061	2,082
Srednja vrijednost \pm SD	2,684 \pm 0,126	1,826 \pm 0,086	3,078 \pm 0,038	2,094 \pm 0,026
ANOVA (p-vrijednost)*	0,007			
Saharoza	1,064	0,724	1,986	1,351
	1,134	0,772	1,850	1,258
	1,105	0,752	1,829	1,244
Srednja vrijednost \pm SD	1,101 \pm 0,035	0,749 \pm 0,024	1,888 \pm 0,086	1,285 \pm 0,058
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Laktoza	51,171	34,810	63,873	43,451
	55,079	37,469	63,583	43,254
	53,623	36,478	64,322	43,756
Srednja vrijednost \pm SD	53,291 \pm 1,975	36,252 \pm 1,344	63,926 \pm 0,372	43,487 \pm 0,253
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			

* p < 0,05

Tablica 18. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 2

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)		Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)	
Fruktoza	0,441	0,306	0,355	0,247
	0,468	0,325	0,360	0,250
	0,461	0,320	0,374	0,260
Srednja vrijednost \pm SD	0,457 \pm 0,014	0,317 \pm 0,010	0,363 \pm 0,010	0,252 \pm 0,007
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			
Glukoza	0,413	0,287	0,642	0,446
	0,413	0,287	0,613	0,426
	0,403	0,280	0,605	0,420
Srednja vrijednost \pm SD	0,410 \pm 0,006	0,284 \pm 0,004	0,620 \pm 0,020	0,431 \pm 0,014
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Saharoza	0,336	0,234	0,190	0,132
	0,534	0,371	0,196	0,136
	0,354	0,246	0,192	0,133
Srednja vrijednost \pm SD	0,408 \pm 0,109	0,283 \pm 0,076	0,193 \pm 0,003	0,134 \pm 0,002
ANOVA (p-vrijednost)*	0,027			
Laktoza	55,849	38,784	64,614	44,871
	55,940	38,848	60,165	41,781
	56,785	39,434	64,336	44,677
Srednja vrijednost \pm SD	56,192 \pm 0,516	39,022 \pm 0,359	63,038 \pm 2,492	43,777 \pm 1,731
ANOVA (p-vrijednost)*	0,010			

* p < 0,05

Tablica 19. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 3

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,438	0,311	0,406	0,288
	0,445	0,315	0,398	0,283
	0,463	0,328	0,444	0,315
Srednja vrijednost ± SD	0,449 ± 0,013	0,318 ± 0,009	0,416 ± 0,024	0,295 ± 0,017
ANOVA (p-vrijednost)*	0,109			
Glukoza	0,168	0,119	0,462	0,328
	0,152	0,108	0,490	0,347
	0,121	0,086	0,479	0,340
Srednja vrijednost ± SD	0,147 ± 0,024	0,104 ± 0,017	0,447 ± 0,014	0,338 ± 0,010
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Saharoza	0,244	0,173	0,369	0,262
	0,249	0,177	0,295	0,210
	0,255	0,181	0,288	0,205
Srednja vrijednost ± SD	0,250 ± 0,006	0,177 ± 0,004	0,318 ± 0,045	0,225 ± 0,032
ANOVA (p-vrijednost)*	0,059			
Laktoza	59,517	42,211	69,610	49,369
	58,764	41,676	70,648	50,105
	59,310	42,064	68,808	48,800
Srednja vrijednost ± SD	59,197 ± 0,389	41,984 ± 0,276	69,689 ± 0,922	49,425 ± 0,654
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			

* p < 0,05

Tablica 20. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 4

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,448 0,448 0,452	0,323 0,322 0,325	Pik nije utvr en.	
Srednja vrijednost \pm SD	0,449 \pm 0,002	0,323 \pm 0,001	Pik nije utvr en.	
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Glukoza	0,208 0,206 0,301	0,150 0,149 0,216	0,496 0,486 0,473	0,357 0,350 0,340
Srednja vrijednost \pm SD	0,239 \pm 0,054	0,172 \pm 0,039	0,485 \pm 0,011	0,349 \pm 0,008
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			
Saharoza	0,262 0,255 0,262	0,188 0,183 0,188	Pik nije utvr en.	
Srednja vrijednost \pm SD	0,259 \pm 0,004	0,187 \pm 0,003	Pik nije utvr en.	
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Laktoza	52,986 52,329 52,048	38,120 37,646 37,445	67,465 68,269 68,443	48,536 49,114 49,240
Srednja vrijednost \pm SD	52,454 \pm 0,482	37,737 \pm 0,346	68,059 \pm 0,522	48,963 \pm 0,375
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			

* p < 0,05

Tablica 21. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 5

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,389	0,276	1,254	0,890
	0,393	0,279	1,283	0,910
	0,394	0,279	Pik nije utvrđen.	
Srednja vrijednost ± SD	0,392 ± 0,002	0,278 ± 0,002	0,846 ± 0,733	0,900 ± 0,520
ANOVA (p-vrijednost)*	0,344			
Glukoza	0,534	0,378	1,184	0,840
	0,171	0,121	1,173	0,832
	0,673	0,477	1,190	0,844
Srednja vrijednost ± SD	0,459 ± 0,259	0,326 ± 0,184	1,182 ± 0,009	0,839 ± 0,006
ANOVA (p-vrijednost)*	0,008			
Saharoza	0,233	0,165	0,204	0,145
	0,411	0,292	0,211	0,150
	0,405	0,287	0,197	0,140
Srednja vrijednost ± SD	0,350 ± 0,101	0,248 ± 0,072	0,204 ± 0,007	0,145 ± 0,005
ANOVA (p-vrijednost)*	0,068			
Laktoza	58,858	41,743	86,078	61,048
	59,738	42,367	86,631	61,440
	58,991	41,837	84,901	60,214
Srednja vrijednost ± SD	59,195 ± 0,474	41,983 ± 0,337	85,870 ± 0,883	60,901 ± 0,626
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			

* p < 0,05

Tablica 22. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 6

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)		Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)	
Fruktoza	1,032	0,688	1,034	0,689
	1,461	0,974	0,904	0,603
	1,122	0,748	0,941	0,627
Srednja vrijednost ± SD	1,205 ± 0,226	0,803 ± 0,151	0,960 ± 0,067	0,640 ± 0,045
ANOVA (p-vrijednost)*	0,146			
Glukoza	2,678	1,785	2,876	1,917
	2,410	1,606	2,705	1,803
	2,619	1,746	2,768	1,845
Srednja vrijednost ± SD	2,569 ± 0,141	1,712 ± 0,094	2,783 ± 0,087	1,855 ± 0,058
ANOVA (p-vrijednost)*	0,088			
Saharoza	0,341	0,227	1,353	0,902
	0,323	0,215	1,413	0,942
	0,722	0,481	1,428	0,952
Srednja vrijednost ± SD	0,462 ± 0,225	0,308 ± 0,150	1,398 ± 0,040	0,932 ± 0,026
ANOVA (p-vrijednost)*	0,002			
Laktoza	40,327	26,884	45,987	30,658
	40,109	26,739	46,009	30,673
	42,256	28,170	45,263	30,175
Srednja vrijednost ± SD	40,897 ± 1,181	27,265 ± 0,788	45,753 ± 0,424	30,502 ± 0,283
ANOVA (p-vrijednost)*	0,003			

* p < 0,05

Tablica 23. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 7

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,457	0,311	0,096	0,066
	0,490	0,334	0,359	0,244
	0,453	0,308	0,369	0,251
Srednja vrijednost ± SD	0,467 ± 0,020	0,318 ± 0,014	0,275 ± 0,155	0,187 ± 0,105
ANOVA (p-vrijednost)*	0,100			
Glukoza	2,884	1,962	2,996	2,038
	3,058	2,080	2,825	1,922
	3,013	2,050	2,894	1,969
Srednja vrijednost ± SD	2,985 ± 0,091	2,031 ± 0,062	2,905 ± 0,086	1,976 ± 0,058
ANOVA (p-vrijednost)*	0,329			
Saharoza	1,302	0,886	1,615	1,099
	1,317	0,896	1,811	1,232
	1,316	0,896	2,094	1,424
Srednja vrijednost ± SD	1,312 ± 0,009	0,892 ± 0,006	1,840 ± 0,240	1,099 ± 0,164
ANOVA (p-vrijednost)*	0,019			
Laktoza	59,018	40,148	63,586	43,256
	60,330	41,041	64,269	43,720
	59,520	40,490	64,703	44,016
Srednja vrijednost ± SD	59,623 ± 0,662	40,560 ± 0,450	64,186 ± 0,563	43,664 ± 0,383
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			

* p < 0,05

Tablica 24. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 8

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)		Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)	
Fruktoza	0,591	0,432	1,413	1,031
	0,898	0,655	1,316	0,960
	0,955	0,697	1,270	0,927
Srednja vrijednost ± SD	0,815 ± 0,196	0,595 ± 0,143	1,333 ± 0,073	0,973 ± 0,053
ANOVA (p-vrijednost)*	0,013			
Glukoza	0,505	0,369	1,936	1,413
	0,526	0,384	1,561	1,139
	0,611	0,446	1,560	1,139
Srednja vrijednost ± SD	0,548 ± 0,056	0,400 ± 0,041	1,686 ± 0,217	1,231 ± 0,158
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			
Saharoza	0,893	0,652	1,582	1,155
	0,841	0,614	0,781	0,570
	1,189	0,868	0,809	0,591
Srednja vrijednost ± SD	0,947 ± 0,188	0,711 ± 0,137	1,058 ± 0,455	0,772 ± 0,332
ANOVA (p-vrijednost)*	0,783			
Laktoza	48,161	35,154	66,617	48,625
	50,892	37,148	64,879	47,357
	53,401	38,979	65,114	47,528
Srednja vrijednost ± SD	50,818 ± 2,621	37,093 ± 1,913	65,537 ± 0,943	47,837 ± 0,688
ANOVA (p-vrijednost)*	0,001			

* p < 0,05

Tablica 25. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 9

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,352	0,259	1,211	0,890
	0,386	0,284	1,256	0,924
	0,357	0,262	1,374	1,011
Srednja vrijednost ± SD	0,365 ± 0,018	0,268 ± 0,013	1,281 ± 0,084	0,942 ± 0,062
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Glukoza	0,703	0,517	1,290	0,948
	0,553	0,407	1,452	1,068
	0,806	0,592	1,284	0,944
Srednja vrijednost ± SD	0,687 ± 0,127	0,505 ± 0,093	1,342 ± 0,096	0,987 ± 0,070
ANOVA (p-vrijednost)*	0,002			
Saharoza	0,416	0,306	0,185	0,136
	0,447	0,329	0,178	0,131
	0,390	0,287	0,161	0,119
Srednja vrijednost ± SD	0,418 ± 0,029	0,307 ± 0,021	0,175 ± 0,012	0,128 ± 0,009
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Laktoza	50,563	37,179	62,390	45,875
	51,504	37,871	62,703	46,105
	50,398	37,057	62,578	46,014
Srednja vrijednost ± SD	50,822 ± 0,597	37,369 ± 0,439	62,557 ± 0,158	45,998 ± 0,116
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			

* p < 0,05

Tablica 26. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 10

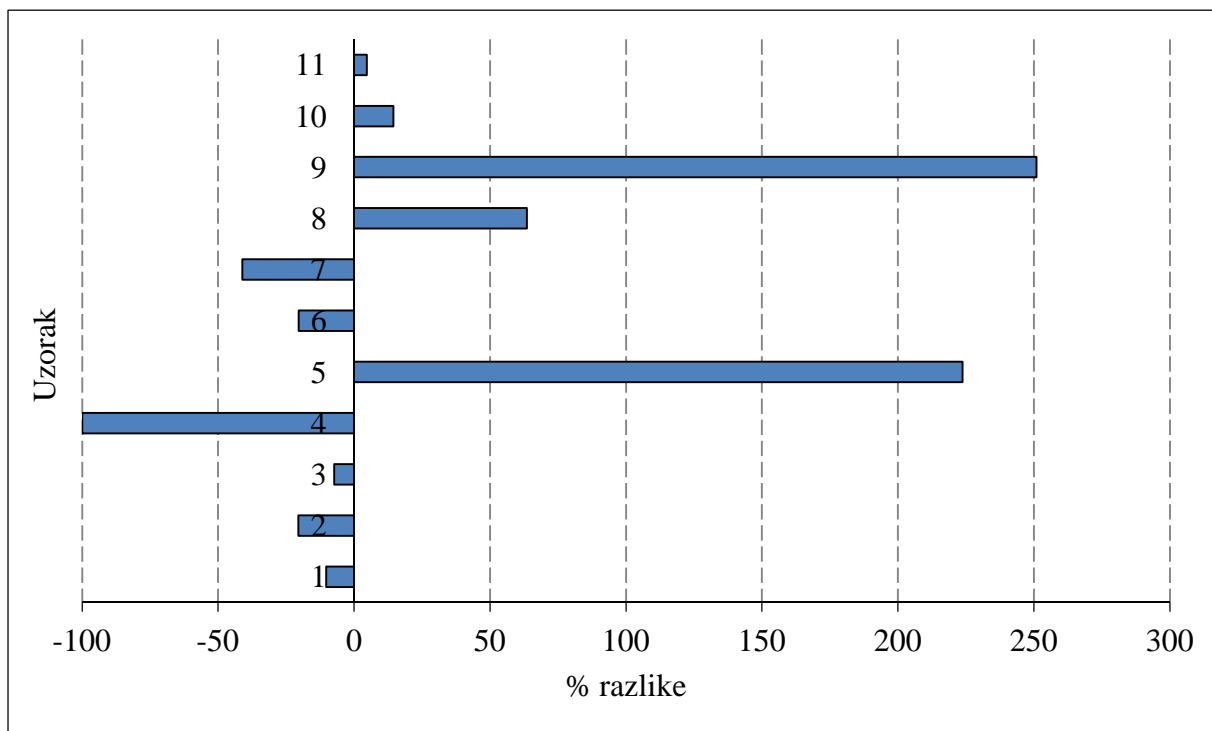
Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha	Koncentracija u pripremljenoj hrani (mg/mL)	g/100 g praha
Fruktoza	0,349	0,271	0,355	0,275
	0,403	0,312	0,507	0,393
	0,366	0,284	0,418	0,324
Srednja vrijednost ± SD	0,373 ± 0,028	0,289 ± 0,021	0,427 ± 0,077	0,331 ± 0,059
ANOVA (p-vrijednost)*	0,317			
Glukoza	0,117	0,091	0,498	0,386
	0,122	0,095	0,463	0,359
	0,120	0,093	0,544	0,422
Srednja vrijednost ± SD	0,120 ± 0,002	0,093 ± 0,002	0,502 ± 0,041	0,389 ± 0,032
ANOVA (p-vrijednost)*	0,000			
Saharoza	0,438	0,339	0,213	0,165
	0,369	0,286	0,213	0,165
	0,386	0,300	0,319	0,247
Srednja vrijednost ± SD	0,398 ± 0,036	0,308 ± 0,028	0,248 ± 0,061	0,192 ± 0,048
ANOVA (p-vrijednost)*	0,022			
Laktoza	56,266	43,617	59,125	45,834
	55,620	43,116	60,446	46,857
	54,938	42,588	60,815	47,143
Srednja vrijednost ± SD	55,608 ± 0,664	43,107 ± 0,514	60,129 ± 0,888	46,611 ± 0,689
ANOVA (p-vrijednost)*	0,002			

* p < 0,05

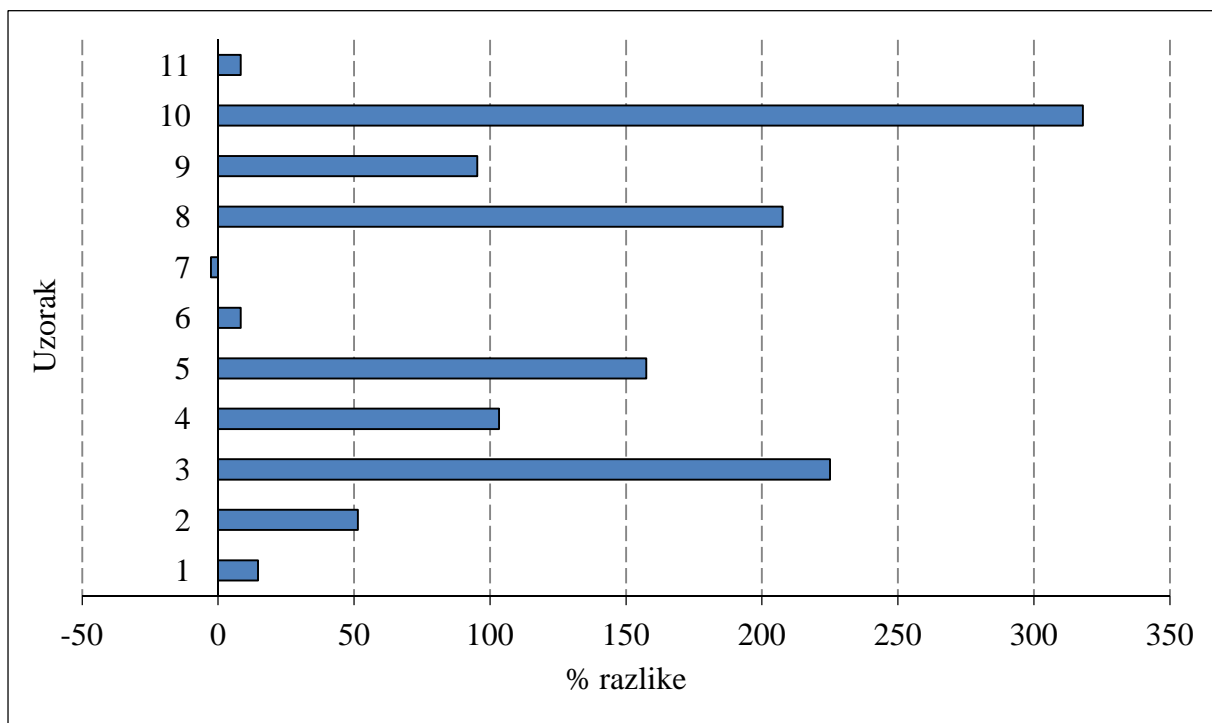
Tablica 27. Rezultati određivanja ugljikohidrata u Uzorku 11

Ugljikohidrat	1. MJERENJE		2. MJERENJE	
	Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)		Koncentracija u pripremljenoj g/100 g praha hrani (mg/mL)	
Fruktoza	12,196	9,454	12,581	9,753
	12,005	9,306	12,656	9,811
	12,392	9,606	13,068	10,130
Srednja vrijednost \pm SD	12,198 \pm 0,194	9,456 \pm 0,150	12,769 \pm 0,262	9,898 \pm 0,203
ANOVA (p-vrijednost)*	0,039			
Glukoza	4,015	3,112	4,108	3,184
	3,815	2,957	4,233	3,281
	4,024	3,120	4,502	3,490
Srednja vrijednost \pm SD	3,951 \pm 0,118	3,063 \pm 0,092	4,281 \pm 0,201	3,319 \pm 0,156
ANOVA (p-vrijednost)*	0,071			
Saharoza	0,284	0,220	0,335	0,260
	0,217	0,168	0,307	0,238
	0,208	0,162	0,340	0,263
Srednja vrijednost \pm SD	0,237 \pm 0,041	0,183 \pm 0,032	0,327 \pm 0,018	0,254 \pm 0,014
ANOVA (p-vrijednost)*	0,025			
Laktoza	36,819	28,542	39,098	30,308
	34,859	27,023	38,817	30,091
	36,105	27,988	39,891	30,924
Srednja vrijednost \pm SD	35,928 \pm 0,992	27,851 \pm 0,769	39,269 \pm 0,557	30,441 \pm 0,432
ANOVA (p-vrijednost)*	0,007			

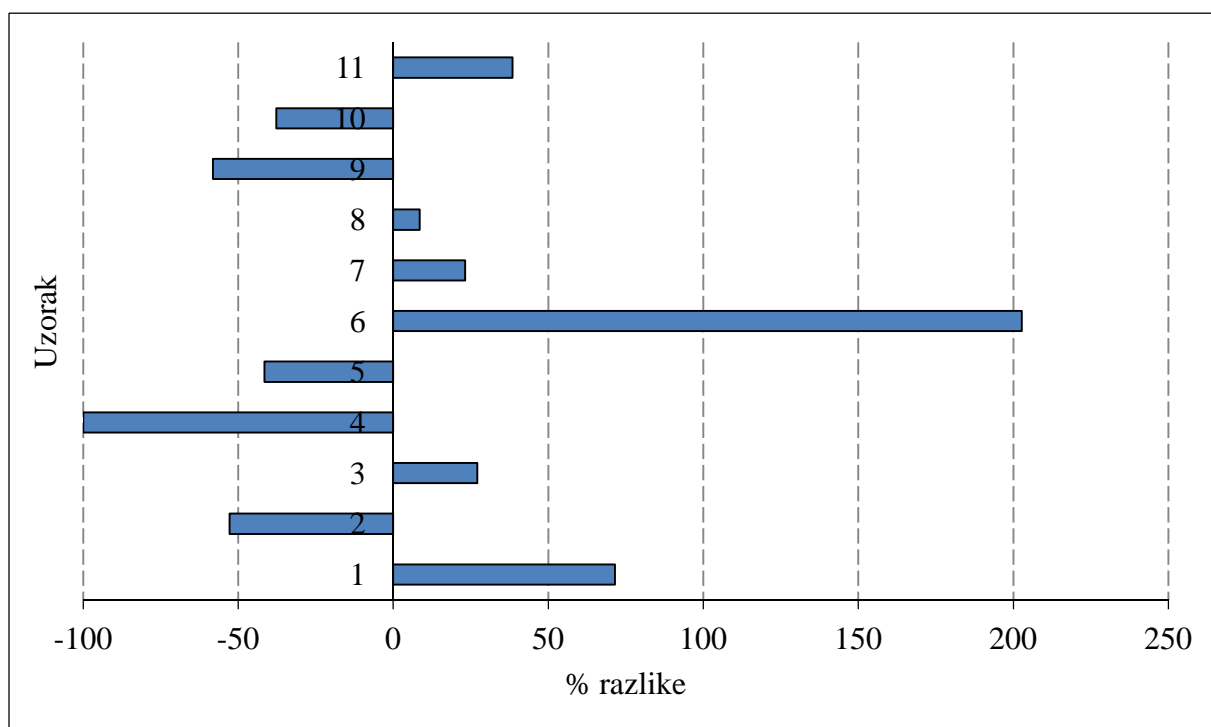
* p < 0,05



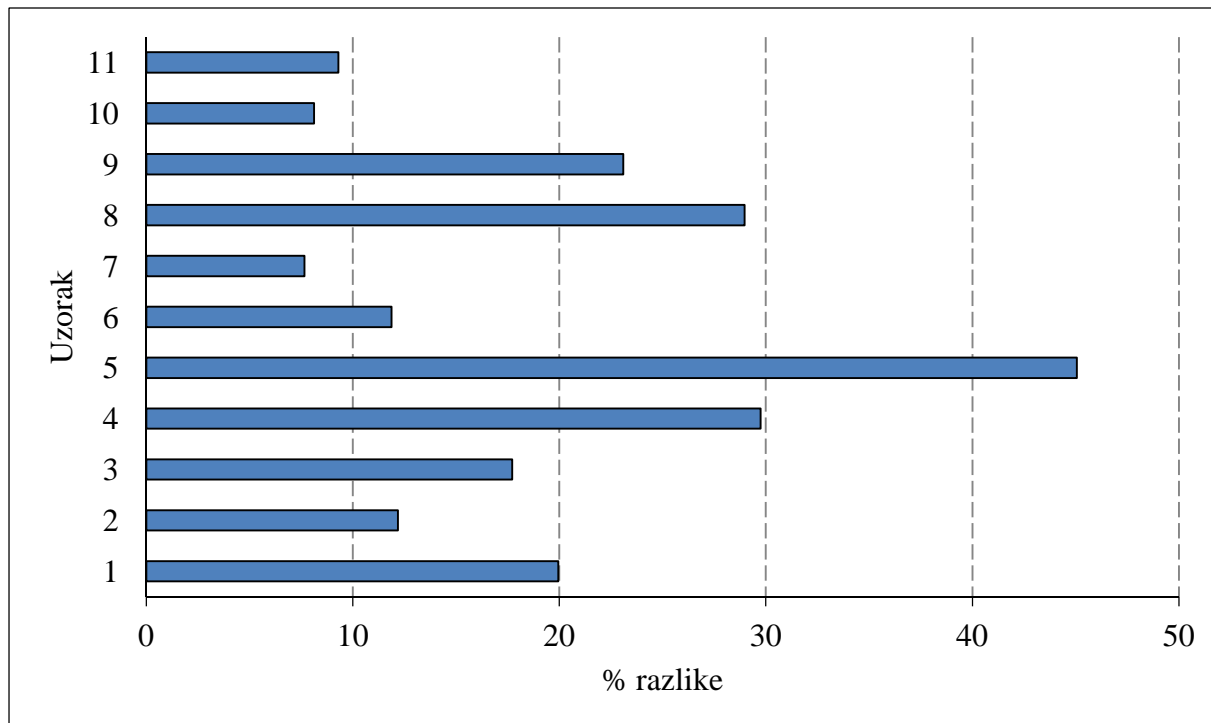
Slika 16. Grafi ki prikaz postotka razlike udjela fruktoze dobivenog mjerenjem pri isteku roka valjanosti, u odnosu na mjerenje odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta



Slika 17. Grafi ki prikaz postotka razlike udjela glukoze dobivenog mjerenjem pri isteku roka valjanosti, u odnosu na mjerenje odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta



Slika 18. Grafi ki prikaz postotka razlike udjela saharoze dobivenog mjerenjem pri isteku roka valjanosti, u odnosu na mjerenje odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta



Slika 19. Grafi ki prikaz postotka razlike udjela laktoze dobivenog mjerenjem pri isteku roka valjanosti, u odnosu na mjerenje odmah nakon prikupljanja uzoraka s hrvatskog tržišta

5. RASPRAVA

5.1. VALIDACIJA METODE

U ovom je radu provedena validacija HPLC-RI metode za određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze u uzorcima hrane za dojenčad. Chávez-Servin i sur. su validirali HPLC-RI metodu za određivanje fruktoze, glukoze, saharoze, laktoze, laktuloze i galaktoze u hrani za dojenčad i drugoj hrani baziranoj na mlijeku [90], dok su Xinmin i sur. su validirali istu metodu za određivanje laktoze u hrani baziranoj na mlijeku [94]. Ferreira i sur. su ispitali linearnost HPLC-RI metode u svrhu određivanja glukoze, galaktoze, saharoze, laktoze i maltoze u hrani za dojenčad i majčinom mlijeku [92].

5.1.1. Selektivnost

Na kromatogramu mobilne faze moguće je uočiti da ne postoji signal koji bi mogao interferirati sa signalom određenih ugljikohidrata (Slika 1.). Ispitivana je otopina standarda i utvrđeno je retencijsko vrijeme za svaki od ugljikohidrata. Srednje retencijsko vrijeme pri ispitivanju standarda iznosi 6,42 minuta za fruktozu, 7,50 minuta za glukozu, 9,20 minuta za saharozu i 10,65 minuta za laktozu (Slika 2.). Na kromatogramu dobivenom ispitivanjem otopine uzorka vidi se da se retencijsko vrijeme svih određenih ugljikohidrata nije značajno razlikovalo od retencijskih vremena dobivenih ispitivanjem otopine standarda (Slika 3.). Također, dokazano je da se retencijska vremena ispitivanih ugljikohidrata ne preklapaju te da je moguće njihovo istovremeno određivanje. Stoga se može zaključiti da je metoda, pri navedenim uvjetima, selektivna i specifična pri određivanju fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze.

5.1.2. Linearnost i podru je

U svrhu ispitivanja linearnosti provedeno je mjerenje na pet koncentracijskih razina u rasponu od 80 do 120 % od o ekivane koncentracije analita u tri ponavljanja.

Podru je metode u kojem je odre ivana linearnost za fruktozu je od 0,840 do 3,736 mg/mL (Tablica 3.). Raspon koncentracija u kojem su Chávez-Servin i sur. odre ivali linearnost metode za fruktozu je od 0,5 do 10 mg/mL [90].

Podru je metode u kojem je odre ivana linearnost za glukozu je od 0,948 do 3,780 mg/mL (Tablica 5.). Raspon koncentracija u kojem su Chávez-Servin i sur. odre ivali linearnost metode za glukozu je od 0,5 do 10 mg/mL [90], a Ferreira i sur. od 0,5 do 30 mg/mL [92].

Podru je metode u kojem je odre ivana linearnost za saharozu je od 0,808 do 3,876 mg/mL (Tablica 7.). Raspon koncentracija u kojem su Chávez-Servin i sur. odre ivali linearnost metode za saharozu je od 0,5 do 10 mg/mL [90], a Ferreira i sur. od 0,5 do 30 mg/mL [92].

Podru je metode u kojem je odre ivana linearnost za laktozu je od 7,984 do 37,920 mg/mL (Tablica 9.). Raspon koncentracija u kojem su Chávez-Servin i sur. odre ivali linearnost metode za laktozu je od 2 do 15 mg/mL [90], Ferreira i sur. od 0,5 do 30 mg/mL [92], a Xinmin i sur. od 1 do 20 mg/mL [94].

Na slikama 5., 7., 9. i 11. prikazana je ovisnost omjera površine pika i koncentracije te logaritma koncentracije pojedinog ugljikohidrata (fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze) koja pobliže prikazuje linearnost metode u ispitivanom području.

Dobivena jednadžba regresijskog pravca za fruktozu glasi $y = 145633x - 14037$, uz koeficijent korelacije veći od 0,999 (Slika 4.). Dobivena jednadžba regresijskog pravca za glukozu glasi $y = 145633x - 14037$, uz koeficijent korelacije veći od 0,999 (Slika 6.). Dobivena jednadžba regresijskog pravca za saharozu glasi $y = 134847x - 6486,5$, uz koeficijent korelacije veći od 0,999 (Slika 8.). Dobivena jednadžba regresijskog pravca glasi za laktozu $y = 121763x + 5267,5$, uz koeficijent korelacije veći od 0,999 (Slika 10.). Koeficijent korelacije dobiven od strane drugih istraživača bio je veći od 0,999 pri ispitivanju svakog pojedinog ugljikohidrata [90,92,94].

U ovom je istraživanju utvrđen linearan odnos između koncentracije ugljikohidrata i odziva detektora u ispitivanom području metode. Pri određivanju linearnosti, koeficijent korelacije je pri ispitivanju svih ugljikohidrata veći od 0,999, što je ujedno i kriterij prihvatljivosti. Iz navedenog se može zaključiti da dobiveni rezultati zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Rezultati drugih istraživača također zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti, a raspon koncentracija za pojedini ugljikohidrat razlikovao se ovisno o namijenjenoj primjeni metode.

5.1.3. Preciznost

Repetibilnost metode određena je iz rezultata mjerenja na tri koncentracijske razine u tri uzastopna ponavljanja.

Pri odreivanju fruktoze, dobivena relativna standardna devijacija površine pika je 0,54 %, a retencijskog vremena 0,05 % (Tablica 11.). Relativna standardna devijacija površine pika fruktoze utvrđena od strane Chávez-Servin i sur. iznosi 0,78 % [90].

Pri odreivanju glukoze, dobivena relativna standardna devijacija površine pika je 0,60 %, a retencijskog vremena 0,04 % (Tablica 11.).

Pri odreivanju saharoze, dobivena relativna standardna devijacija površine pika je 0,36 %, a retencijskog vremena 0,06 % (Tablica 11.). Relativna standardna devijacija površine pika saharoze utvrđena od strane Chávez-Servin i sur. iznosi 0,99 % [90].

Pri odreivanju laktoze, dobivena relativna standardna devijacija površine pika je 0,41 %, a retencijskog vremena 0,08 % (Tablica 11.). Relativna standardna devijacija površine pika laktoze utvrđena od strane Chávez-Servin i sur. iznosi 0,46 % [90], a od strane Xinmin i sur. 1,06 % [94].

Da bi se metodu razvijenu u ovom istraživanju moglo smatrati repetibilnom, maksimalna dozvoljena relativna standardna devijacija pri odreivanju fruktoze, glukoze i saharoze je 3,7 %, a pri odreivanju laktoze 1,9 % (Tablica 2.). Pošto je relativna standardna devijacija pri odreivanju svih ugljikohidrata unutar prihvatljivih vrijednosti, može se zaključiti da dobiveni rezultati zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti.

Iz navedenog se može zaključiti da je u ovom radu postignuta veća repetibilnost mjerenja pri odreivanju fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze u odnosu na rezultate ispitivanja drugih istraživača.

5.1.4. To nost

Kako bi se utvrdila to nost metode provedeno je ispitivanje otopina uzorka u koje je dodana poznata koli ina standarda odre ivanih ugljikohidrata na pet koncentracijskih razina u tri ponavljanja.

Dobivena srednja vrijednost iskorištenja za fruktozu je 94,82 % (RSD = 1,89 %) (Tablica 12.). Srednje iskorištenje za fruktozu koje su Chávez-Servin i sur. utvrdili iznosi 106 % (RSD = 2,22 %) iji je udjel u uzorku bio 13 % [90].

Dobivena srednja vrijednost iskorištenja za glukozu je 100,41 % (RSD = 1,25 %) (Tablica 13.). Srednje iskorištenje za glukozu koje su Chávez-Servin i sur. utvrdili iznosi 111,5 % (RSD = 4,48 %) koja nije detektirana u uzorku [90].

Dobivena srednja vrijednost iskorištenja za saharozu je 104,84 % (RSD = 3,05 %) (Tablica 14.). Srednje iskorištenje za saharozu koje su Chávez-Servin i sur. utvrdili iznosi 100 % (RSD = 3,40 %) iji je udjel u uzorku bio 9 % [90].

Dobivena srednja vrijednost iskorištenja je za laktozu 99,11 % (RSD = 1,61 %) (Tablica 15.). Srednje iskorištenje za laktozu koje su Chávez-Servin i sur. utvrdili iznosi 101,5 % (RSD = 3,45 %) iji je udjel u uzorku bio 16 % [90], a Xinmin i sur. 97,6 % (RSD = 2,24 %), a njen je udjel u uzorku 33,50 % [94].

Da bi se moglo konstatirati da je metoda razvijena u ovom istraživanju to na, iskorištenje za fruktozu, glukozu i saharozu treba se nalaziti u rasponu od 95 do 105 %, a za laktozu od 98 do 102 % (Tablica 2.). Iz dobivenih rezultata možemo zaklju iti da se ovom

metodom postiže odgovaraju a to nost i da je zadovoljen kriterij prihvatljivosti pri odre ivanju svih ugljikohidrata. Usporedbom rezultata drugih istraživa a s dozvoljenim rasponom iskorištenja, mogu e je uo iti da je kriterij prihvatljivosti zadovoljen jedino kod saharoze i laktoze.

Iako se udjel pojedinih ugljikohidrata u uzorku razlikovao, pri usporedbi s rezultatima dobivenim od strane drugih istraživa a, može se zaklju iti da je u ovom radu postignuta ve a to nost za fruktozu, glukozu i laktozu, a manja za saharozu.

5.1.5. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Kako bi se utvrdila osjetljivost metode pri odre ivanju fruktoze, glukozе, saharoze i laktoze odre ena je granica detekcije i granica kvantifikacije. Odre ene su metodom omjera signala i šuma, pri emu je kod granice detekcije minimalan prihvatljiv omjer 3:1, a 10:1 kod granice kvantifikacije.

Izra unata granica detekcije za fruktozu iznosi 0,020 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,068 mg/mL (Tablica 16.). Granica detekcije za fruktozu dobivena u istraživanju Chávez-Servin i sur. iznosi 0,17 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,27 mg/mL [90].

Izra unata granica detekcije za glukozu iznosi 0,029 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,095 mg/mL (Tablica 16.). Granica detekcije za glukozu dobivena u istraživanju Chávez-Servin i sur. iznosi 0,13 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,24 mg/mL [90].

Izra unata granica detekcije za saharozu iznosi 0,035 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,117 mg/mL (Tablica 16.). Granica detekcije za saharozu dobivena u istraživanju Chávez-

Servin i sur. iznosi 0,16 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,26 mg/mL [90].

Izra unata granica detekcije za laktozu iznosi 0,060 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,201 mg/mL (Tablica 16.). Granica detekcije za laktozu dobivena u istraživanju Chávez-Servin i sur. iznosi 0,25 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,38 mg/mL [90]. Granica detekcije za laktozu dobivena u istraživanju Xinmin i sur. 0,13 mg/mL, a granica kvantifikacije 0,24 mg/mL [94].

Podaci dobiveni u ovom istraživanju dokazuju osjetljivost metode pri određivanju navedenih ugljikohidrata.

Pri usporedbi s rezultatima dobivenim od strane drugih istraživača, uočljivo je da su u ovom radu granica detekcije i granica kvantifikacije niže, tj. postignuta je veća osjetljivost metode pri određivanju svakog od ugljikohidrata.

5.2. ODREĐIVANJE UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJENČAD

U ovom radu određivan je udjel ugljikohidrata u 11 uzoraka hrane za dojenčad pomoću prethodno validirane metode. Chávez-Servín i sur. su u jednom uzorku hrane za dojenčad ispitivali prisutnost fruktoze, glukoze, saharoze, laktoze, laktuloze i galaktoze [90], a Ferreira i sur. su ispitivali prisutnost glukoze, galaktoze, saharoze, laktoze i maltoze u 18 uzoraka početne hrane i 13 uzoraka prijelazne hrane za dojenčad [92].

Utvrđeni raspon udjela fruktoze je od 0,289 do 9,456 g/100 g praha, dok se njena koncentracija u pripremljenoj hrani kretala u rasponu od 0,373 do 12,198 mg/mL. Najmanji udjel fruktoze utvrđen je u Uzorku 10 (Tablica 26.), a najveći u Uzorku 11 (Tablica 27.).

Značajan udjel fruktoze uočen je jedino u Uzorku 11 (Tablica 27.).

Utvrđeni raspon udjela glukoze je od 0,093 do 3,063 g/100 g praha, dok se njena koncentracija u pripremljenoj hrani kretala u rasponu od 0,120 do 3,951 mg/mL. Najmanji udjel glukoze utvrđen je u Uzorku 10 (Tablica 26.), a najveći u Uzorku 11 (Tablica 27.). Značajan udjel glukoze uočen je jedino u Uzorku 11 (Tablica 27.). Udjel glukoze u prijelaznoj hrani za dojenčad utvrđen od strane Ferreira i sur. iznosi od 0,5 do 2,5 g/100 g praha [92].

Utvrđeni raspon udjela saharoze je od 0,183 do 0,892 g/100 g praha, dok se njena koncentracija u pripremljenoj hrani kretala u rasponu od 0,237 do 1,312 mg/mL. Najmanji udjel saharoze utvrđen je u Uzorku 11 (Tablica 27.), a najveći u Uzorku 7 (Tablica 23.). Značajan udjel saharoze nije uočeni niti u jednom uzorku. Udjel saharoze u prijelaznoj hrani za dojenčad utvrđen od strane Ferreira i sur. iznosi od 5,2 do 7,1 g/100 g praha [92].

Utvrđeni raspon udjela laktoze je od 27,265 do 40,560 g/100 g praha, dok se njena koncentracija u pripremljenoj hrani kretala u rasponu od 35,928 do 59,623 mg/mL. Najmanja koncentracija laktoze utvrđena je u Uzorku 11 (Tablica 27.), a najveća u Uzorku 7 (Tablica 23.). Uzorak koji su analizirali Chávez-Servín i sur. sadržavao je samo laktozu u udjelu od 57,2 g/100 g praha [90]. Ferreira i sur. su laktozu kao jedini ugljikohidrat odredili u početnoj hrani i njezin je udjel iznosio od 35,9 do 58,2 g/100 g praha, dok je prijelazna hrana za dojenčad sadržavala laktozu u udjelu od 26,7 do 57,6 g/100 g praha [92].

Kod nekih je uzoraka uočena povezanost između nižeg udjela laktoze i prisutnosti drugih ugljikohidrata. Pri analizi udjela ugljikohidrata u Uzorku 11 uočene su najviše vrijednosti za udjel fruktoze (9,456 g/100 g praha) i glukoze (3,063 g/100 g praha) što je

razumljivo budu i da je rije o hrani namijenjenoj za malu djecu u kojoj je udjel laktoze smanjen (27,851 g/100 g praha) (Tablica 27.). Usprkos tome što je u Uzorku 6 uo en najniži udjel laktoze (27,265 g/100 g praha), nije zamijenjen zna ajno ve im udjelom glukoze (1,712 g/100 g praha) niti ve im udjelom fruktoze (0,803 g/100 g praha) i saharoze (0,308 g/100 g praha) u odnosu na uzorke s ve im udjelom laktoze (Tablica 22.). Ferreira i sur. su tako er utvrdili povezanost izme u nižeg udjela laktoze i prisutnosti drugih ugljikohidrata. Uzorci u kojima je udjel laktoze bio manji od 48 g/100 g praha, sadržavali su saharozu, glukozu i maltozu (od 0,6 do 4,9 g/100 g praha) ili pak kombinaciju sva tri ugljikohidrata [92].

5.3. ISPITIVANJE PROMJENE UDJELA UGLJIKOHIDRATA U HRANI ZA DOJEN AD USLIJED SKLADIŠTENJA

Nakon 20 mjeseci skladištenja, pri isteku roka valjanosti, ponovljeno je odre ivanje udjela ugljikohidrata na istim uzorcima hrane za dojen ad.

Uo ena je razlika u udjelu ugljikohidrata u odnosu na prvo mjerenje i to od -100,00 do 251,00 % za fruktozu (Slika 16.), od -2,68 do 317,99 % za glukozu (Slika 17.), od -100,00 do 202,66 % za saharozu (Slika 18.) te od 8,13 do 45,06 % za laktozu (Slika 19.).

U usporedbi s prvim mjerenjem, u Uzorku 7 (Tablica 23.) uo eno je smanjenje udjela fruktoze (-41,13 %) (Slika 16.) i glukoze (-2,68 %) (Slika 17.), a pove anje udjela saharoze (23,17 %) (Slika 18.) i laktoze (7,65 %) (Slika 19.).

U Uzorku 2 i 4 (Tablica 18. i 20.) uo eno je smanjenje udjela fruktoze (-20,50 %, -100 %) (Slika 16.) i saharoze (-52,82 %, -100 %) (Slika 18.), a pove anje udjela glukoze (51,54 %, 103,26 %) (Slika 17.) i laktoze (12,18 %, 29,75 %) (Slika 19.).

U Uzorku 1, 3 i 6 (Tablica 17., 19. i 22.) uo eno je smanjenje udjela fruktoze (-10,29 %, -7,29 %, -20,34 %) (Slika 16.), a pove anje udjela glukoze (14,67 %, 225,03 %, 8,34 %) (Slika 17.), saharoze (71,52 %, 27,15 %, 202,66 %) (Slika 18.) i laktoze (19,96 %, 17,72 %, 11,87 %) (Slika 19.).

U Uzorku 5, 9 i 10 (Tablica 21., 25. i 26.) uo eno je smanjenje udjela saharoze (-41,53 %, -58,17 %, -37,71 %) (Slika 18.), a pove anje udjela fruktoze (223,74 %, 251,00 %, 14,43 %) (Slika 16.), glukoze (157,51 %, 95,26 %, 317,99 %) (Slika 17.) i laktoze (45,06 %, 23,09 %, 8,13 %) (Slika 19.).

U Uzorku 8 i 11 (Tablica 24. i 27.) uo eno je pove anje udjela fruktoze (63,54 %, 4,68 %) (Slika 16.), glukoze (207,65 %, 8,34 %) (Slika 17.), saharoze (8,57 %, 38,44 %) (Slika 18.) i laktoze (28,96 %, 9,30 %) (Slika 19.).

Pove anje udjela fruktoze u odnosu na prvo mjerenje uo eno je u pet uzoraka, udjela glukoze u deset uzoraka, udjela saharoze u šest uzoraka, a udjela laktoze u svim uzorcima.

Statisti ki zna ajna razlika (p-vrijednost manja od 0,05) udjela fruktoze nakon skladištenja uo ena je u Uzorku 1, 2, 4, 8, 9 i 11 (Tablica 17., 18., 20., 24., 25. i 27.), udjela glukoze u Uzorku 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 i 10 (Tablica 17., 18., 19., 20., 21., 24., 25. i 26.) te udjela saharoze u Uzorku 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10 i 11 (Tablica 17., 18., 20., 22., 23., 25., 26. i 27.). Statisti ki zna ajna razlika udjela laktoze nakon skladištenja uo ena je u svim ispitivanim uzorcima (od Tablice 17. do Tablice 27.).

Chávez-Servín i sur. su ispitivali promjene udjela ugljikohidrata u jednom uzorku hrane za dojen ad skladištenom 12 mjeseci pri sobnoj temperaturi. Prethodno je ispitana prisutnost fruktoze, glukoze, saharoze, laktoze, laktuloze i galaktoze, no uzorak je sadržavao laktozu u udjelu od 65,0 g/100 g praha i saharozu koja je količina bila ispod granice kvantifikacije (manje od 0,20 mg/mL). Nakon tri mjeseca skladištenja došlo je do smanjenja udjela laktoze što su pripisali formiranju laktulozil-lizina, spoja koji nastaje u prisutnosti aminokiseline lizina. U nastavku skladištenja nisu uočene nove promjene udjela laktoze [148].

Iz navedenog se može zaključiti da je došlo do promjene udjela ugljikohidrata u ispitivanim uzorcima te da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdio razlog tih promjena.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu je razvijena i validirana HPLC-RI metoda za određivanje ugljikohidrata (glukoze, fruktoze, saharoze i laktoze) u hrani za dojenčad. Određeni su udjeli navedenih ugljikohidrata u hrani za dojenčad i ispitane su moguće promjene njihovog udjela uslijed skladištenja. S obzirom na obradu dobivenih rezultata, te njihovim razmatranjem može se zaključiti:

- Razvijena je jednostavna, brza i ekonomična HPLC-RI metoda prikladna za određivanje ugljikohidrata (fruktoza, glukoza, saharoza, laktoza) u uzorcima hrane za dojenčad.
- Ključni parametri pri validaciji razvijene metode su selektivnost, linearnost, područje, preciznost, točnost, granica detekcije i granica kvantifikacije.
- Pri određivanju ugljikohidrata izostaju interferencije nepoznatih spojeva te međusobne interferencije određenih ugljikohidrata što dokazuje da je metoda selektivna i specifična.
- Metoda zadovoljava kriterij linearnosti u ispitivanom području uz koeficijent korelacije veći od 0,999.
- Vrijednost relativne standardne devijacije za repetibilnost mjerenja ne prelazi 0,60 % što dokazuje da je metoda precizna.

- Postignuto iskorištenje metode je u rasponu od 94,82 % do 104,84 % što dokazuje da je metoda to na.
- Vrijednostima za granicu detekcije i granicu kvantifikacije dokazano je da je metoda osjetljiva.
- HPLC-RI metoda pod navedenim uvjetima zadovoljava kriterije prihvatljivosti odre ivanih parametara validacije te se može smatrati prikladnom za odre ivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze u hrani za dojen ad.
- Dobiveni rezultati udjela ugljikohidrata u hrani za dojen ad su u skladu s podacima u literaturi.
- Prilikom skladištenja hrane za dojen ad 20 mjeseci pri sobnoj temperaturi došlo je do promjene udjela ugljikohidrata.
- Validirana HPLC metoda razvijena u ovom istraživanju mogla bi imati veliku primjenu u prehrambenoj industriji i pra enju sigurnosti hrane za dojen ad, zbog svoje mogu nosti rutinskog odre ivanja sastava i udjela ugljikohidrata u hrani za dojen ad.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Mirjani Hruškar, izv. prof. koja je omogućila izradu ovoga rada te asistentima dipl. ing. Nikoli Majoru i dr. sc. Marini Krpan na velikom strpljenju, pomoći i korisnim savjetima koji su pridonijeli njegovoj izradi.

8. POPIS LITERATURE

- [1] Fewtrell, M.S. (2011) The evidence for public health recommendations on infant feeding. *Early Hum. Dev.* **87**, 715-721.
- [2] Riordan, J. (2004) The biological specificity of breast milk. U: *Breastfeeding and human lactation*, Jones and Bartlett, Boston.
- [3] Picciano, M.F. (2001) Nutrient composition of human milk. *Pediatr. Clin. N. Am.* **48**, 53-67.
- [4] Kunz, C., Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., Jensen, R. (1999) Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin. Perinatol.* **26**, 307-333.
- [5] Rodriguez-Palmero, M., Koletzko, B., Kunz, C., Jensen, R. (1999) Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. *Clin. Perinatol.* **26**, 335-359.
- [6] Hanson, L.A. (2004) *Immunobiology of human milk: how breastfeeding protects babies*, Pharmasoft Publishing, Texas.
- [7] Innis, S.M. (2007) Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *P. Nutr. Soc.* **66**, 397-404.
- [8] Serpero, L.D., Frigiola, A., Gazzolo, D. (2012) Human milk and formulae: Neurotrophic and new biological factors. *Early Hum. Dev.* **88**, 9-12.
- [9] Walker, A. (2010) Breast Milk as the Gold Standard for Protective Nutrients. *J. Pediatr.* **156**, 3-7.
- [10] Klaus, M. (1998) Mother and infant: early emotional ties. *Pediatrics* **102**, 1244-1246.

-
- [11] Moore, E.R., Anderson, G.C., Bergman, N. (2007) Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *Cochrane Db. Syst. Rev.* **3**.
- [12] WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality (2000) Effect of breastfeeding on infant and childhood mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. *Lancet* **355**, 451-455.
- [13] Bahl, R., Frost, C., Kirkwood, B.R., Edmond, K., Martines, J., Bhandari, N., Arthur, P. (2005) Infant feeding patterns and risks of death and hospitalization in the first half of infancy: multicentre cohort study. *B. World Health Organ.* **83**, 418-426.
- [14] Hauck, F.R., Thompson, J.M.D., Tanabe, K.O., Moon, R.Y., Vennemann, M.M. (2011) Breastfeeding and Reduced Risk of Sudden Infant Death Syndrome: A Meta-analysis. *Pediatrics* **128**, 103-110.
- [15] Quigley, M.A., Kelly, Y.J., Sacker, A. (2007) Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millenium Cohort Study. *Pediatrics* **119**, 837-842.
- [16] Bachrach, V.R., Schwarz, E., Bachrach, L.R. (2003) Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory diseases in infancy: a meta-analysis. *Arch. Pediat. Adol. Med.* **157**, 237-243.
- [17] Van Rossum, C.M.T., Büchner, F.L., Hoekstra, J. (2005) *Quantification of health effects of breastfeeding. Review of the literature and model situation* [online], Netherlands National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, <<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/350040001.pdf>>. Pristupljeno 24. ožujka 2012.
- [18] AHRQ (2007) *Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries*, Agency for Healthcare Research and Quality [online], Rockville, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK38337/>>. Pristupljeno 24. ožujka 2012.

-
- [19] Marild, S., Hansson, S., Jodal, U., Oden, A., Svedberg, K. (2004) Protective effect of breastfeeding against urinary tract infection. *Acta Paediatr.* **93**, 164-168.
- [20] Gdalevich, M., Mimouni, D., Mimouni, M. (2001) Breastfeeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. *J. Pediatr.* **139**, 261-266.
- [21] Oddy, W.H., Sherriff, J.L., De Klerk, N.H., Kendall, G.E., Sly, P.D., Beilin, J.L., Blake, K.B., Landau, L.I., Stanley, F.J. (2004) The relation of breastfeeding and Body Mass Index to asthma and atopy in children: a prospective cohort study to age 6 years. *Am. J. Public Health* **94**, 1531-1537.
- [22] Sadauskaite-Kuehne, V., Ludvigsson, J., Padaiga, Z., Jasinskiene, E., Samuelsson, U. (2004) Longer breast feeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diab. Metab. Res. Rev.* **20**, 150-157.
- [23] Kwan, M.L., Buffler, P.A., Abrams, B., Kiley, V.A. (2004) Breastfeeding and the risk of childhood leukaemia: a meta-analysis. *Public Health Rep.* **119**, 521-535.
- [24] Akobeng, A.K., Ramanan, A.V., Buchan, I., Heller, R.F. (2006) Effect of breastfeeding on risk of coeliac disease: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Arch. Dis. Child.* **91**, 39-43.
- [25] Klement, E., Cohen, R.V., Boxman, J., Joseph, A., Reif, S. (2004) Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1342-1352.
- [26] Harder, T., Bergmann, R., Kallischnigg, G., Plagemann, A. (2005) Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 397-403.
- [27] Burke, V., Beilin, L.J., Simmer, K., Oddy, W.H., Blake, K.V., Doherty, D., Kendall, G.E., Newnham, J.P., Landau, L.I., Stanley, F.J. (2005) Breastfeeding and overweight: longitudinal analysis in an Australian birth cohort. *J. Pediatr.* **147**, 56-61.

-
- [28] Martin, R.M., Gunnell, D., Davey-Smith, G. (2005) Breastfeeding in infancy and blood pressure in later life: systemic review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* **161**, 15-26.
- [29] Owen, C.G., Whincup, P.H., Odoki, C., Gilg, J.A., Cook, D.G. (2002) Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* **110**, 597-608.
- [30] Martin, R.M., Ebrahim, S., Griffin, M., Davey-Smith, G., Nicolaides, A.N., Georgiou, N., Watson, S., Frankel, S., Holly, J.M.P., Gunnell, D. (2005) Breastfeeding and atherosclerosis: intima media thickness and plaques at 65-year follow-up of the Boyd Orr Cohort. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1482-1488.
- [31] Parikh, N.I., Hwang, S.J., Ingelsson, E., Benjamin, E.J., Fox, C.S., Vasan, R.S., Murabito, J.M. (2009) Breastfeeding in Infancy and Adult Cardiovascular Disease Risk Factors. *Am. J. Med.* **122**, 656-663.
- [32] Goodwin, D.W., Gabrielli, W.J., Penick, E.C., Nickel, E.J., Chhibber., S. (1999) Breast feeding and alcoholism: the Trotter hypotesis. *Am. J. Psychiat.* **156**, 650-652.
- [33] Anderson, J.W., Johnstone, B.M., Remley, D.T. (1999) Breastfeeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 525-535.
- [34] Kramer, M.S., Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R.W., Matush, L., Igumnov, S., Fombonne, E., Bogdanovich, N., Ducruet, T., Collet, J.P., Chalmers, B., Hodnett, E., Davidovsky, S., Skugarevsky, O., Trofimovich, O., Kozlova, L., Shapiro, S. (2007) Breastfeeding and child cognitive development. New evidence from a large randomized trial. *Arch. Gen. Psychiatry* **65**, 578-584.
- [35] Emmett, P.M., Rogers, I.S. (1997) Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum. Dev.* **49**, 7-28.
- [36] Mikkola, K., Ritari, N., Tommiska, V., Salokorpi, T., Lehtonen, L., Tammela, O. (2005) Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996-1997. *Pediatrics* **116**, 1391-1400.

-
- [37] Wojcik, K.Y., Rechtman, D.J., Lee, M.L., Montoya, A., Medo, E.T. (2009) Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J. Am. Diet. Assoc.* **109**, 137-140.
- [38] Bauer, J., Gerss, J. (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin. Nutr.* **30**, 215-220.
- [39] Kramer, M.S., Kakuma, R. (2002) *The optimal duration of exclusive breastfeeding: a systematic review*, World Health Organization, Geneva.
- [40] WHO/UNICEF/USAID (2008) *Indicators for assessing infant and young child feeding practices*, World Health Organization, Geneva.
- [41] Butte, N.F., Lopez-Alarcon, M.G., Garza, C. (2002) *Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life*, World Health Organization, Geneva.
- [42] ESPGHAN Committee on Nutrition (2009) Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* **49**, 112-125.
- [43] Dewey, K., Brown, K. (2003) Update on technical issues concerning complementary feeding of young children in developing countries and implications for intervention programs. *Food Nutr. Bull.* **24**, 5-28.
- [44] WHO (2009) *Infant and young child feeding: Model Chapter for textbooks for medical students and allied health professionals*, World Health Organization, Geneva.
- [45] PAHO/WHO (2002) *Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child*, Pan American Health Organization/World Health Organization, Washington DC.
- [46] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002) Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* **360**, 187-195.

-
- [47] Robenblatt, K., Thomas, D. (1993) Lactation and the risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Epidemiol.* **22**, 192-197.
- [48] Dewey, K.G, Cohen, R.J., Brown, K.H., Landa-Rivera, L. (2001) Effects of exclusive breastfeeding for 4 versus 6 months on maternal nutritional status and infant motor development: results of two randomized trials in Honduras. *J. Nutr.* **131**, 262-267.
- [49] Siskind, V., Green, A., Bain, C., Purdie, D. (1997) Breastfeeding, menopause and epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* **8**, 188-191.
- [50] Jansen, J., de Weerth, C., Riksen-Walraven, J.M. (2008) Breastfeeding and the mother–infant relationship: A review. *Dev. Rev.* **28**, 503-521.
- [51] Østbye, T., Krause, K.M., Swamy, G.K., Lovelady, S.A. (2010) Effect of breastfeeding on weight retention from one pregnancy to the next: Results from the North Carolina WIC program. *Prev.Med.* **51**, 368-372.
- [52] Morrow, A.L. (2011) Infant Feeding in the 21st Century. *J. Pediatr. Health Car.* **25**, 195-197.
- [53] Institute of Medicine (2004) *Infant formula: evaluating the safety of new ingredients*, The National Academies Press, Washington DC.
- [54] Bocca, B., Alimonti, A., Coni, E., Di Pasquale, M., Giglio, L., Bocca, P.A., Caroli, S. (2000) Determination of the total content and binding pattern of elements in human milk by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta* **53**, 295-303.
- [55] Wappelhorst, O., Kühn, I., Heidenreich, H., Markert, B. (2002) Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* **18**, 316-322.
- [56] Rossipal, E., Krachler, M. (1998) Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nutr. Res.* **18**, 11-24.

-
- [57] Alles, M.S., Scholtens, P.A.M.J., Bindels, J.G. (2004) Current trends in the composition of infant milk formulas. *Curr. Paediatr.* **14**, 51-63.
- [58] Lesniewicz, A., Wroz, A., Wojcik, A., Zyrnicki, W. (2010) Mineral and nutritional analysis of Polish infant formulas. *J. Food Comp. Anal.* **23**, 424-431.
- [59] Pravilnik o hrani za dojen ad i malu djecu te prera enoj hrani na bazi žitarica za dojen ad i malu djecu (2008) Narodne novine **74**, Zagreb.
- [60] Maldonado, J., Gilb, A., Narbonaa, E., Molinaa, J.A. (1998) Special formulas in infant nutrition: a review. *Early Hum. Dev.* **53**, 23-32.
- [61] Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Neto, U.F., Gopalan, S., Hernell, O., Hock, Q.S., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y., Zong-Yi, D. (2005) Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **41**, 584-599.
- [62] Canadian Paediatric Society, Dietitians of Canada nad Health Canada (2005) *Nutrition for Healthy Term Infants*, Minister of Public Works and Government Services, Ottawa.
- [63] Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J., Rieu, D., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D. (2006) Soy Protein Infant Formulae and Follow-On Formulae: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **42**, 352-361.
- [64] Friedman, N.J., Zeiger, R.S. (2005) The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1238-1248.
- [65] Schmidl, M.K., Labuza, T.P. (2000) *Essential of Functional Foods* [online], Aspen Publishers, Gaithersburg, < <http://books.google.ca/books>>. Pristupljeno 25.03.2011.
- [66] Emmett, P.M., Rogers, I.S. (1997) Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum. Dev.* **49**, 7-28.

-
- [67] CODEX STAN 72-1981:2011., Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants.
- [68] Schaller, J.P., Buck, R.H. Rueda, R. (2007) Ribonucleotides: Conditionally essential nutrients shown to enhance immune function and reduce diarrheal disease in infants. *Semin. Fetal Neonat. M.* **12**, 35-44.
- [69] Alliet, P., Scholtens, P., Raes, M., Hensen, K., Jongen, H., Rummens, J.L., Boehm, G., Vandenplas, Y. (2007) Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. *Nutrition* **23**, 719-723.
- [70] Puccio, G., Cajozzo, C., Meli, F., Rochat, F., Grathwohl, D., Steenhout, P. (2007) Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition* **23**, 1-8.
- [71] Costalos, C., Kapiki, A., Apostolou, M., Papatoma, E. (2008) The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early Hum. Dev.* **84**, 45-49.
- [72] Bruzzese, E., Volpicelli, M., Squeglia, V., Bruzzese, D., Salvini, F., Bisceglia, M., Lionetti, P., Cinquetti, M., Iacono, G., Amarri, S., Guarino, A. (2009) A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. *Clin. Nutr.* **28**, 156-161.
- [73] Villares, J.M.M. (2010) Prebiotics in Infant Formulas: Risks and Benefits. U: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (Watson, R.R., Preedy, V.R., ured.), Elsevier Inc., Burlington, str. 117-131.
- [74] Hickey, R.M. (2012) The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *Int. Dairy J.* **22**, 141-146.

-
- [75] Rodriguez, A., Raederstorff, D., Sarda, P., Lauret, C., Mendy, F., Descomps, B. (2003) Preterm infant formula supplementation with alpha linolenic acid and docosahexaenoic acid. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 727-734.
- [76] Clandinin, M.T., van Aerde, J.E., Merkel, K.L., Harris, C.L., Springer, M.A., Hansen, J.W., Diersen-Schade, D.A. (2005) Growth and development of preterm infants fed infant formulas containing docosahexaenoic acid and arachidonic acid. *J. Pediatr.* **146**, 461-468.
- [77] Birch, E.E., Garfield, S., Castañeda, Y., Hughbanks-Wheaton, D., Uauy, R., Hoffman, D. (2007) Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Hum. Dev.* **83**, 279-284.
- [78] Uauy, R., Hoffman, D.R., Mena, P., Llanos, A., Birch, E.E. (2003) Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* **143**, 17-25.
- [79] Pratt, H.F. (1984) Breastfeeding and eczema. *Early Hum. Dev.* **9**, 283-290.
- [80] Riordan, J.M. (1997) The cost of not breastfeeding: a commentary. *J. Hum. Lact.* **13**, 93-97.
- [81] Kerr, M., Désirée, L. (2008) Neurodevelopmental Delays Associated With Iron-Fortified Formula for Healthy Infants. *Medscape Psychiatry and Mental Health* [online], <<http://www.medscape.com/viewarticle/574363>>. Pristupljeno 25.03.2012.
- [82] Forsythe S. (2005) Enterobacter sakazakii and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern. Child Nutr.* **1**, 44-50.
- [83] Kim, K., Jang, S.S., Kim, S.K., Park, J.H., Heu, S., Ryu, S. (2008) Prevalence and genetic diversity of Enterobacter sakazakii in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 196-203.

-
- [84] Osaili, T., Forsythe, S. (2009) Desiccation resistance and persistence of Cronobacter species in infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* **136**, 214-220.
- [85] FAO/WHO (2008) *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae: Meeting report* [online], <http://typo3.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jemra/mra15_sakazaki.pdf>. Pristupljeno 25.03.2012.
- [86] FAO/WHO (2006) *Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula: Meeting report* [online], < <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10.pdf>>. Pristupljeno 25.03.2012.
- [87] WHO/FAO (2007) *Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula: guidelines*, World Health Organization, Geneva.
- [88] Setchell, K., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1997) Exposure to phyto-oestrogens from soy-based formula. *Lancet* **350**, 23-27.
- [89] Wu, T.C., Huang, I.F., Chen, Y.C., Chen, P.H., Yang, L.Y. (2011) Differences in serum biochemistry between breast-fed and formula-fed infants. *J. Chin. Med. Assoc.* **74**, 511-515.
- [90] Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2004) Analysis of mono and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr. A* **1043**, 211-215.
- [91] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. (2010) *Introduction to modern liquid chromatography*, 3. izd., John Wiley & Sons Inc., Hoboken/New Jersey.
- [92] Ferreira, I.M.P.L.V.O., Gomes, A.M.P., Ferreira, M.A. (1998) Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydr. Polym.* **37**, 225-229.
- [93] Scott, F., Hatina, G. (1988) HPLC determination of sugars, starch and oligosaccharides in infant formulas using resin-based, fixed-ion columns. *J. Food Sci.* **53**, 264-269.

-
- [94] Xinmin, W., Ruili, Z., Zhihua, L., Yuanhong, W., Tingfu, J. (2008) Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography. *J. Food Comp. Anal.* **21**, 255-258.
- [95] Cataldi, T.R.I., Angelotti, M., Bianco, G. (2003) Determination of mono- and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **485**, 43-49.
- [96] Kaine, L.A., Wolnik, K.A. (1998) Detection of Counterfeit and Relabeled Infant Formulas by High-pH Anion-Exchange Chromatography - Pulsed Amperometric Detection for the Determination of Sugar Profiles. *J. Chromatogr. A* **804**, 279-287.
- [97] Troyano, E., Olano, A., Villamiel, M., Sanz, J., Martínez-Castro, I. (1996) Monosaccharides and myo-inositol in commercial milks. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 815-817.
- [98] Moros, J., Garrigues, S., de la Guardia, M. (2007) Evaluation of nutritional parameters in infant formulas and powdered milk by Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **593**, 30-38.
- [99] Brereton, P., Hasnip, S., Bertrand, A., Wittkowski, R., Guillou, C. (2003) Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trends Anal. Chem.* **2**, 19-25.
- [100] Gonzàles, A.S.P., Naranjo, G.B., Malec, L.S., Vigo, M.S. (2003) Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. *Int. Dairy J.* **13**, 95-99.
- [101] Bertrand, G. (1906) Le dosage des sucres reducteurs. *B. Soc. Chim. Par.* **292**, 1285-1299.
- [102] Polish Standard: PN-A-79011-5:1998., Dry food mixes-test methodsdetermination of sugar content.
- [103] Zhang, X., Cao, Y., Ye, J. (2001) Determination of lactose in sugar-free milk powder by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* **72**, 385-388.
- [104] Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. (2012) Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J. Chromatogr. A* **1232**, 101-109.

-
- [105] Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B* **877**, 2224-2234.
- [106] Peters, F.T., Drummer, O. H., Musshoff, F. (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165**, 216-224.
- [107] Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **74**, 835-855.
- [108] ISO/IEC 17025: 2005., General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.
- [109] EURACHEM Working Group (1998) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM, Teddington.
- [110] EURACHEM/CITAC Working Group (2011) *EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3.izd, EURACHEM, Teddington.
- [111] ISO (2006) *ISO International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM)*, International Organization for Standardization, Geneva.
- [112] AOAC (1975) *Statistics Manual of the AOAC*, Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg.
- [113] ICH (2005) *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, International Conference on Harmonisation, Geneva.
- [114] Pocklington, W.D. (1990) *Guidelines for the Development of Standard Methods by Collaborative Trial*, Laboratory of the Government Chemist Library, Teddington.
- [115] IUPAC (1999) *Harmonised Guidelines for In-House Validation of Methods of Analysis (Technical Report)*, International Union of Pure Applied Chemistry, Budapest.

-
- [116] USP (2006) USP 29-NF 24: *Validation of Compendial Methods*, United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville.
- [117] IUPAC (1995) Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. *Pure Appl. Chem.* **62**, 149-162.
- [118] FDA (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Rockville.
- [119] FDA (2000) *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Method Validation, Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation – Draft Guidance*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, Rockville.
- [120] European Union Decision 2002/657/EC (2002) *Off. J. Eur. Commun.* **221**, 8-36.
- [121] ISO 5725: 1994., Application of the Statistics – Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement – Parts 1-6.
- [122] FAO (1998) *Validation of analytical methods for food control*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- [123] AOAC (1990) *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- [124] Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W.A., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A. (2000) Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* **17**, 1551-1557.
- [125] Hartmann, C., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L., McDowall, R.D. (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods (review). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 193-218.

-
- [126] Peters, F.T., Maurer, H.H. (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology-a review. *Accred. Qual. Assur.* **7**, 441-449.
- [127] Épshtein, N.A. (2004) Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharm. Chem. J.* **38**, 212-228.
- [128] Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* **23**, 535-552.
- [129] Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F.X. (2004) Validation of qualitative analytical methods. *Trends Anal. Chem.* **23**, 137-145.
- [130] Peters, F.T. (2006) Method validation using LC-MS. U: *Applications of liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Toxicology* (Poletti, A., ured.), Pharmaceutical Press, London.
- [131] Feinberg, M. (2007) Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J. Chromatogr. A* **1158**, 174-183.
- [132] Hubert, P., N'guyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewe, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L. (2004) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 579-586.
- [133] Hubert, P., N'guyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewe, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., Rozet, E. (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part II. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 70-81.

-
- [134] Hubert, P., N'guyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewe, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., Rozet, E. (2007) Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 82-96.
- [135] González, A.G., Herrador, M.A. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal. Chem.* **26**, 227-238.
- [136] Bouabidi, A., Rozet, E., Fillet, M., Ziemons, E., Chapuzet, E., Mertens, B., Klinkenberg, R. (2010) Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3180-3192.
- [137] Boulanger, B., Chiap, P., Dewe, W., Crommen, J., Hubert, P. (2003) An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**, 753-765.
- [138] Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S., Boulanger, B., Hubert, P. (2007) Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. Chromatogr. A* **1158**, 111-125.
- [139] WELAC (1993) *Guidance Document WG D2*, EURACHEM/ Western European Laboratory Accreditation Cooperation Chemistry, Teddington, 1993.
- [140] AOAC (2011) *Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SPMR) Documents*, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- [141] Miller, J.N., Miller, J.C. (2000) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Prentice-Hall, Harlow.

-
- [142] Vander-Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G., Massart, D.L. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 723-753.
- [143] Saffaj, T., Ihssaneb, B. (2011) Uncertainty profiles for the validation of analytical methods. *Talanta* **85**, 1535-1542.
- [144] ISO 21748:2010., Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation.
- [145] ISO/IEC Guide 98-3:2008., Uncertainty of measurement - Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement.
- [146] EA (2004) *EA Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing (EA-4/16)*, European co-operation for Accreditation, Paris.
- [147] Barwick, V.J., Ellison, S.L.R. (2000) *Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part D: Protocol for uncertainty evaluation from validation data*, Valid Analytical Measurement, Teddington.
- [148] Chávez-Servín, J.L., Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2006) Evolution of free mono- and di-saccharide content of milk-based formula powder during storage. *Food Chem.* **97**, 103-108.

9. SAŽETAK

Autor: Saša Ajredini

Naslov rada: Razvoj i validacija metode za određivanje ugljikohidrata u uzorcima hrane za dojenčad u svrhu praćenja sigurnosti

Razvijena je i validirana jednostavna, brza i ekonomična HPLC-RI metoda za određivanje fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze u hrani za dojenčad. Metoda je pokazala dobru selektivnost i linearnost u ispitivanom području uz koeficijent korelacije veći od 0,999. Iskorištenje pri određivanju svih ugljikohidrata bilo je u rasponu od 94,82 % do 104,84 %. Relativna standardna devijacija (RSD) repetibilnosti mjerenja fruktoze, glukoze, saharoze i laktoze bila je 0,54, 0,60, 0,36 i 0,41 %. Granice detekcije bile su 0,020, 0,029, 0,035 i 0,060 mg/mL, a granice kvantifikacije 0,068, 0,095, 0,117 i 0,201 mg/mL. HPLC-RI metoda korištena je za ispitivanje promjena u udjelu ugljikohidrata tijekom skladištenja unutar roka valjanosti hrane za dojenčad koja je bila skladištena 20 mjeseci pri sobnoj temperaturi. U prvom mjerenju se udjel ugljikohidrata u 11 uzoraka kretao za fruktozu od 0,289 do 9,456 g/100 g proizvoda, za glukozu od 0,093 do 3,063 g/100 g proizvoda, za saharozu od 0,183 do 0,892 g/100 g proizvoda i za laktozu od 27,265 do 40,560 g/100 g proizvoda. Uočena je razlika u udjelu ugljikohidrata u odnosu na prvo mjerenje i to od -100,00 do 251,00 % za fruktozu, od -2,68 do 317,99 % za glukozu, od -100,00 do 202,66 % za saharozu te od 8,13 do 45,06 % za laktozu.

Ključne riječi: HPLC, hrana za dojenčad, skladištenje, ugljikohidrati, validacija

10. SUMMARY

Author: Saša Ajredini

Title: Development and validation of a method for carbohydrate content determination in infant formulas samples in a safety monitoring

A simple, rapid and economic method for the analysis of fructose, glucose, sucrose, lactose in infant formula by HPLC-RI was developed and validated. The method showed good selectivity and linearity in specified range with correlation coefficients exceeding 0.999, respectively. Recoveries for all carbohydrates were between 94.82 % and 104.84 %, respectively. The relative standard deviations (RSD) for repeatability of measurement for fructose, glucose, sucrose and lactose were 0.54, 0.60, 0.36, 0.41 %, respectively. The limits of detection were 0.020, 0.029, 0.035, 0.060 mg/mL, respectively; and the limits of quantification 0.068, 0.095, 0.117, 0.201 mg/mL. HPLC-RI was used to evaluate changes in carbohydrate content during infant formula shelf-life which were stored for 20 months at room temperature. At the first measurement of 11 samples carbohydrate content in 100 g of product varied for fructose from 0.289 to 9.456, for glucose from 0.093 to 3.063, for sucrose from 0.183 to 0.892 and for lactose from 27.265 to 40.560, respectively. The observed relative difference from the first measurement in carbohydrate content was from -100.00 to 251.00 % for fructose, from -2.68 to 225.03 % for glucose, from -100.00 to 317.99 % for sucrose and from 8.13 to 45.06 % for lactose.

Key words: *carbohydrates, HPLC, infant formula, storage, validation*

11. ŽIVOTOPIS

Saša Ajredini rođena je 05.07.1988. godine u Vukovaru. Od 2003. do 2007. godine pohađala je VII. gimnaziju u Zagrebu, 2007. godine je upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet i 2010. godine završila preddiplomski studij Nutricionizam. Trenutno studira na 2. godini diplomskog studija Upravljanje sigurnošću u hrane. Tijekom studiranja uručene su joj Povelja dekana za ostvarene rezultate u svojoj generaciji na 3. godini preddiplomskog studija Nutricionizam akademske godine 2009./2010., Nagrada dekana za najbolji ukupni prosjek ostvaren na preddiplomskom studiju Nutricionizam akademske godine 2009./2010., novčana potpora iz Fonda za stipendiranje darovitih studenata Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2009./2010. i 2011./2012. te Stipendija Grada Zagreba za akademsku godinu 2011./2012.