Optimizacija i validizacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

Šarčević, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:695226

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

DIPLOMSKI RAD

Ivana Šarčević

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Agroekologija

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

DIPLOMSKI RAD

Ivana Šarčević

Mentor:

doc.dr.sc. Nataša Mikulec

Komentor:

dr.sc. Dario Lasić

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ivana Šarčević**, JMBAG 0178104670, rođen/a 24.09.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____
Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Ivane Šarčević**, JMBAG 0178104670, naslova

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	doc.dr.sc. Nataša Mikulec	mentor	_____
2.	dr.sc. Dario Lasić	komentor	_____
3.	prof.dr.sc. Neven Antunac	član	_____
4.	doc.dr.sc. Aleksandra Perčin	član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem, prije svega, svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataši Mikulec na pruženoj prilici, vrijednim savjetima, velikom strpljenju i nesebičnoj pomoći pri pisanju ovog rada. Veliko hvala i komentoru dr.sc. Dariu Lasiću koji mi je omogućio izvedbu eksperimentalnog dijela diplomskog rada na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar, te na svim savjetima i pomoći pri pisanju rada. Hvala svim prijateljima koji su bili kraj mene, te me motivirali i hrabrili tijekom studiranja.
Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji, ponajviše majci, bez čije podrške, ljubavi i odricanja danas ne bih bila ovdje gdje jesam.

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Ivana Šarčević**, naslova

Optimizacija i validacija HPLC metode za određivanje laktoze u mlijeku

Cilj ovog rada bio je opisati mogućnosti kromatografskih analitičkih metoda u analitici mlijeka i mliječnih proizvoda te određivanje proširene mjerne nesigurnosti. Razvojem i validacijom metode za kvantitativno i kvalitativno određivanje laktoze u mlijeku HPLC-RID (tekućinska kromatografija s diferencijalnim refraktometrom ili detektorom indeksa loma) tehnikom, proveden je eksperimentalni dio rada. Prikazan je postupak validacije HPLC metode pomoću validacijskih parametara propisanih normom HRN ISO 22662:2010 koji su bili nužni kako bi se metoda ispravno valorizirala. Nakon utvrđenih parametara validacije za određivanje udjela laktoze u mlijeku analizirano je 30 uzoraka mlijeka. Na osnovu dobivenih rezultata po pojedinim parametrima validacije može se zaključiti da je HPLC metoda s RID detektorom brza, praktična i precizna metoda za određivanje sadržaja laktoze u mlijeku, te pouzdana za rutinsko korištenje u analitičkim laboratorijima. Rezultati ispitivanja uzoraka mlijeka su uspoređivani sa postojećom deklaracijom te isti upućuju da je metoda ispravno validirana i da daje valjane rezultate.

Ključne riječi: kromatografija, validacija, HPLC, laktoza, mlijeko i mliječni proizvodi.

Summary

Of the master's thesis – student **Ivana Šarčević,** entitled

Optimization and validation of HPLC method for determination of lactose in milk

The aim of this paper was to describe the possibilities of chromatographic analytical methods in the analysis of milk and dairy products, and to determine the extended measurement uncertainty. By developing and validating a method for quantitative and qualitative determination of lactose in milk by HPLC-RID (*Liquid Chromatography with Differential Refractometer or Refractive Index Detector*) technique, the experimental part of the work was performed. The procedure of validation of the HPLC method using validation parameters prescribed by the standard HRN ISO 22662: 2010 is presented, which were necessary for the method to be properly valorized. A total of 30 milk samples were analyzed to determine the lactose content in milk after the validation procedure. Based on the obtained results by individual validation parameters, it can be concluded that the HPLC method with RID detector is a fast, practical and accurate method for determination of lactose content in milk, as well as reliable for routine use in analytical laboratories. The test results of the milk samples were compared with each existing label and indicated that the method is valid and delivers valid results.

Keywords: chromatography, validation, HPLC, lactose, milk and milk products.

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1 Cilj rada 2

2. Kemijski sastav mlijeka 3

2.1 Glavni sastojci mlijeka 3

2.1.1 Mliječna mast 3

2.1.2 Bjelančevine 3

2.1.3 Laktoza 4

2.1.4 Vitamini i minerali 4

3. Tehnike za određivanje ugljikohidrata u mlijeku 6

3.1 Kromatografske tehnike 6

3.1.1 Tekućinska kromatografija 8

3.1.2 Plinska kromatografija 10

4. Osiguranje kvalitete u laboratoriju 11

4.1. Validacija analitičkih metoda 12

4.1.1 Parametri validacije 13

4.1.2 Mjerna nesigurnost 15

5. Materijali i metode 16

5.1. Validacija HPLC-RID metode 16

5.2. Materijali i metode- uzorci mlijeka 17

6. Rezultati i rasprava 19

6.1. Validacija metode 19

6.1.1. Linearnost 19

6.1.2. Iskorištenje (eng. recovery) 20

6.1.3. Ponovljivost 21

6.1.4. Granica kvantifikacije 23

6.2. Rezultati udjela laktoze u uzorcima mlijeka 25

7. Zaključak 32

8. Literatura 33

9. Životopis 36

1. Uvod

Prehrambeni proizvodi koje nalazimo na tržištu moraju biti označeni prema određenim zakonskim regulativama kako bi potrošači imali uvid u točne i potpune informacije o određenom proizvodu. Potrošač mora imati saznanje o podrijetlu, namjeni, nutritivnom sastavu proizvoda te prisutnost ili neprisutnost određenih alergena. Mlijeko je jedno od najčešćih prehrambenih proizvoda u prehrani raznih kultura: kravlje, bivolje, kozje, ovčje mlijeko i mlijeko deva su 5 vrsta mlijeka koja se konzumiraju u današnjem svijetu (Zhu i Guo, 2020.)

Budući je danas u svijetu sva pažnja preusmjerena na sigurnost hrane i ljudsko zdravlje, promatranje i praćenje kvalitete prehrambenih proizvoda, u ovom slučaju mlijeka, dovedeno je na visoku razinu. U prijevodu, u praćenju kvalitete prehrambenih proizvoda, potrebni su nam brzi, jednostavni, pouzdani i isplativi načini i metode kako bi se odredile nutritivne vrijednosti mliječnih proizvoda. U ovom radu prikazana je validacija metode za određivanje udjela laktoze, kao važnog udjela u kemijskom sastavu mlijeka čije prisustvo u današnjem svijetu može biti problematično zbog razvitka intolerancije na laktozu i sve češćoj upotrebi mlijeka bez laktoze. U svrhu određivanja mliječnog šećera u mliječnim proizvodima, kako bi se proizvodi mogli pravilno i propisno deklarirati i staviti na tržište, provodi se postupak validacije analitičke metode za određivanje laktoze.

U radu su opisani glavni sastojci mlijeka, njihova uloga te metode za njihovo određivanje. Također, opisani su načini na koje se može osigurati sigurnost i kvaliteta rada u laboratoriju. Svakom laboratoriju cilj je davati brze, točne i pouzdane rezultate u svrhu osiguranja konkurentnosti na tržištu rada. Iz tog razloga u laboratorijima se provode unutarnja i vanjska ocjenjivanja, akreditacije, međulaboratorijska ispitivanja i između ostalog i validacija (vrednovanje) metoda. Validacija metoda se provodi u slučajevima uvođenja nove metode, promjene laboratorija, promjene analitičara, promjene metode, izmjene postojeće metode te je provodi isti analitičar kako bi osigurao da njegova metoda i nakon određenih promjena daje valjane rezultate. U ovom radu provela se validacija tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti. Odredili su se parametri validacije koji su nužni za validaciju ove metode: linearnost, iskorištenje, granica kvantifikacije i ponovljivost. Linearnost predstavlja direktnu proporcionalnost dobivenih rezultata i količine analita u uzorku unutar definiranog područja metode. Preciznost analitičke metode predstavlja stupanj slaganja između neovisnih rezultata mjerenja koji su dobiveni pod određenim uvjetima. Kod ponovljivosti rezultati su dobiveni pod istim uvjetima tj. isti analitičar, ista aparatura i isti laboratorij, u kratkom vremenskom razmaku. Stupanj iskorištenja je veličina koja opisuje djelotvornost stroja ili metode. S obzirom da se za određivanje udjela laktoze u mlijeku mogu koristiti razne metode, u radu je dan pregled i vrste kromatografskih tehnika koje se mogu koristiti u tu svrhu.

Nakon općenitog pregleda svih validacijskih parametara, poseban osvrt dan je na parametre validacije koji su korišteni u radu. Validacija metode i određivanje laktoze u mlijeku provodila se u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Zagrebu. Validacijski protokol metode tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti za određivanje sadržaja laktoze u mlijeku obuhvatio je određivanje linearnosti, iskorištenja, granice kvantifikacije, ponovljivosti i preciznosti. Na temelju dobivenih parametara validacije izračunata je proširena mjerna nesigurnost metode.

1.1 Cilj rada

Cilj rada bio je validirati metodu za kvalitativno i kvantitativno određivanje laktoze u mlijeku primjenom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Validacijom su obuhvaćeni parametri validacije propisani normom HRN ISO 22662:2010.
Dodatno, nakon provedene validacije, a u svrhu provjere ispravnosti označavanja sadržaja u konzumnom mlijeku u skladu s Uredbom EU 1169/2011 jedan od ciljeva bio je analizirati ukupno 30 uzoraka mlijeka iz trgovačke mreže (10 uzoraka sirovog, nehomogeniziranog mlijeka, 10 uzoraka pasteriziranog i 10 uzoraka steriliziranog mlijeka).

2. Kemijski sastav mlijeka

2.1 Glavni sastojci mlijeka

Mlijeko je jedno od najčešće konzumiranih prehrambenih proizvoda na tržištu. U svom prirodnom sirovom obliku, mlijeko je bogato visoko nutritivnim vrijednostima i odličan je izvor masti, proteina, laktoze, minerala i vitamina (Neumann i sur., 2002). Sastojci mlijeka koji većinom određuju njihovu prehrambenu vrijednost su: mliječna mast, bjelančevine i laktoza. Njihov sadržaj ovisi o hranidbi i kakvoći krmiva kod krava, određen je pasminom i paragenetskim čimbenicima. Mnogi čimbenici kao što su vrsta, stadij laktacije, hranidba i opće zdravlje životinje utječu na kvalitetu i kakvoću mlijeka (Kailasapathy, 2008., O'Mahoney i Fox, 2014.). Mlijeko krava prosječno sadrži 87,5 % vode i 12,5 % suhe tvari, od čega 3,6-3,9% čine masti, 3,3-3,5% bjelančevine, 4,7-4,9% laktoza i 0,7% pepela (Feldhofer i sur., 1999.) Bjelančevine, laktoza i soli povećavaju, a mliječna mast i voda smanjuju gustoću mlijeka (Petričić, 1984., Sabadoš, 1996.)

2.1.1 Mliječna mast

Mliječna mast je jedan od najbitnijih i najpromjenjiviji sastojaka mlijeka, o njenom postotoku ovisi hranidbena i energetska vrijednost mlijeka (Feldhofer i sur., 1999.). Količina i kakvoća mliječne masti u mlijeku je značajna za ljudsku prehranu jer sadrži vitamine topive u mastima (A, D i E), kao i linolnu, linolensku i arahidonsku masne kiseline. Količina mliječne masti u mlijeku može se kretati od 2 do 8%. U mliječnom serumu se nalazi u obliku masnih globula različitih veličina. Mlijeko sadrži više od 200 različitih masnih kiselina i zbog toga je mliječna mast najspecifičnija prirodna mast (Havranek i Antunac, 1996.). Mliječna mast je većinski sadržana u masnim globulima koji čine srž triglicerida okruženih membranom. U mlijeku većine životinjskih vrsta, 97-98% svih masti čine trigliceridi, dok druge masti kao što su diacilglicerol, koresterol, fosfolipidi i slobodne masne kiseline mogu također biti pronađene u tragovima.
Budući trigliceridi čine većinski dio mliječnih masti, svojstva mliječne masti kao što su gustoća i topivost su pod utjecajem isključivo njih.

2.1.2 Bjelančevine

Kao što je poznato bjelančevine su izgrađene od aminokiselina koje su međusobno povezane u lance. Mlijeko sadrži stotine vrsta bjelančevina koje grupiramo u tri grupe: kazeini, bjelančevine sirutke i manje bjelančevine. Bjelančevine u mlijeku ovise o količini u buragu nerazgradivih bjelančevina (Feldhofer i sur, 1999.). Poznato je da su mlijeko i mliječni proizvodi odličan izvor aminokiselina esencijalnih za normalno i pravilno funkcioniranje

organizma. Prema Havranek i Antuncu (1996.) dnevna količina svih esencijalnih aminokiselina može se zadovoljiti konzumacijom pola litre mlijeka.

2.1.3 Laktoza

Laktoza je mliječni šećer koji je disaharid i sastoji se od molekula glukoze i galaktoze. Ona je jedini ugljikohidrat koji se nalazi u mlijeku. Količina laktoze u mlijeku ovisi o količini ostalih topljivih sastojaka u vodi (natrij i kloridi) (Tratnik, 1998.). Prema udjelu laktoza je najstabilniji sastojak mlijeka (Tratnik, 1998). Laktoza je glavni ugljikohidrat u mlijeku većine vrsta i smatra se kao gotov izvor energije za nedonoščad. Veoma bitnu ulogu ima u razvoju živčanog sustava, rastu kože i razvoju kostiju. Zanimljivo je kako ljudi tokom odrastanja izgube enzim laktazu koji je nužan za razgradnju laktoze u tijelu i njenu apsorpciju. Gubitak tog enzima stvara probleme pri probavi laktoze kroz crijeva te dolazi do začepljenja, dijareje, bolova u abdomenu, napuhanosti uzrokovanom intolerancijom na laktozu (Wilt i sur., 2010).

2.1.4 Vitamini i minerali

Poznato je da je mlijeko izvrstan izvor vitamina i minerala i preporuča se konzumacija tijekom odrastanja jer potpomaže jačanju kostiju i zubi. Vitamini u mlijeku dolaze u dvije grupe, prva grupa su vodotopivi vitamini kao na primjer B kompleks i vitamin C, dok drugu grupu čine vitamini topivi u mastima (A, D i E). Prema Renneru (1989.) u tablici 2.1. prikazane su dnevne potrebe ljudi za vitaminima te potrebe koje zadovoljimo s konzumacijom litre mlijeka.

Tablica 2.1. Dnevne potrebe ljudi za vitaminima i udio potreba iz 1L mlijeka

Vitamin	Preporučeno (mg)	% zadovoljenih potreba s 1 L mlijeka
A	1,3/1,2	46
B1 (tiamin)	1,4/1,2	32
B2 (riboflavin)	1,7/1,6	104
B6 (piridoksin)	2,0/1,9	25
B12 (kobalamin)	0,004	113
Nikotinska kiselina	16/14	6
Folna kiselina	0,35	15
Pantotenska kiselina	8	45
C (askorbinska kiselina)	60	30
D (kolekalciferol)	0,0025	32
E (tokoferol)	10	11
K	2	2
biotin	0,2	18

Izvor: Havranek i Antunac (1996.)

Kakvoća mlijeka ne ovisi samo o nutritivnom sastavu već i o mnogim drugim čimbenicima kao što su fizikalna i kemijska svojstva tijekom proizvodnje. Određivanje nutritivnih vrijednosti u mlijeku provodi se svakodnevno kroz laboratorijske analize kao što su npr. instrumentalna infrared metoda, standardna metoda po Gerberu, referentna Röse-Gottlieb metoda za određivanje masti u mlijeku (Xin i sur., 2006.) kao i određivanje laktoze u mlijeku enzimatskom metodom. Prema Inacio-u, de Mouri i de Limi (2011.) referentna metoda koja se koristi u određivanju udjela bjelančevina u mlijeku je metoda po Kjeldahl-u, koja se koristi i kao referentna metoda u tu svrhu. Za određivanje mineralnog sastava mlijeka mogu se koristiti visoko sofisticirane metode kao što su ICP-MS (optička emisijska spektrometrija induktivno spregnute plazme), te jednostavnije titracijske metode.

3. Tehnike za određivanje ugljikohidrata u mlijeku

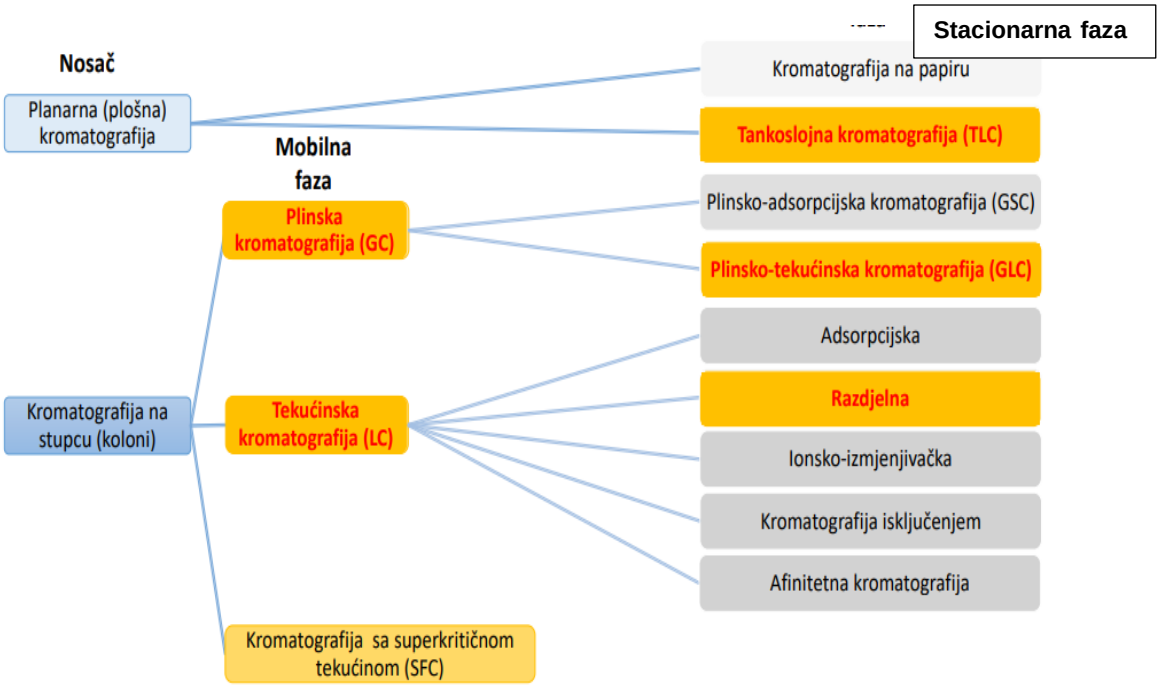
Analitička kemija se koristi kako bi se odredile kvalitativne i kvantitativne komponente određenog uzorka koji analiziramo. I kvantitativni i kvalitativni sastav određenog ispitanog analita nužan nam je kako bismo odredili kvalitetu cjelokupnog uzorka. Kvalitativni sastav daje nam informacije o samom uzorku i prisutnosti određenog analita, dok s druge strane kvantitativna analiza daje informacije o količini tog analita. Unazad dva desetljeća broj tehnika za određivanja sastava mlijeka se iznimno povećao i napredovao, pogotovo u primjeni kromatografije, spektroskopije i senzorike (Zhu i Guo, 2020.). Za određivanje laktoze u mlijeku i mliječnim proizvodima najčešće se koriste enzimatske metode budući su one visoke točnosti i relativno jeftine (Jasti i sur., 2014).

3.1 Kromatografske tehnike

Kromatografija je laboratorijska analitička tehnika za odjeljivanja smjesa koja sama po sebi ima visoku efikasnost. Riječ kromatografija grčki se dijeli na *chromaI* - boja i *graphien* - pisati. Prema IUPAC-u[1] kromatografija je fizikalna metoda odvajanja u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, mobilne i stacionarne, odnosno pokretne i nepokretne faze. Kromatografske metode su široko primjenjive metode koje podrazumijevaju odjeljivanje pomoću kromatografskih postupaka, a zatim i selektivno dokazivanje pojedinačnih analita u smjesama. To je metoda razdvajanja smjese na osnovu različite raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Tehnike odjeljivanja temelje se na adsorbciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni ili isključenju. Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda odjeljivanja u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, gdje stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, dok mobilna može biti tekuća ili plinovita.

Slika 3.1. prikazuje podjelu kromatografije. U njoj postoje stacionarna faza i mobilna faza, te različita vrsta nosača: plošna[2] i kromatografija u stupcu/koloni[3]. U kromatografiji sastojci smijese putuju stacionarnom fazom, a nošeni su mobilnom fazom.

[1] Eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*
[2] Stacionarna faza je nanesena na ravnu plohu, a mobilna faza se kreće djelovanjem sile ili gravitacije.
[3] Stacionarna faza je u uskoj cijevi, a mobilna faza putuje djelovanjem tlaka ili gravitacije.



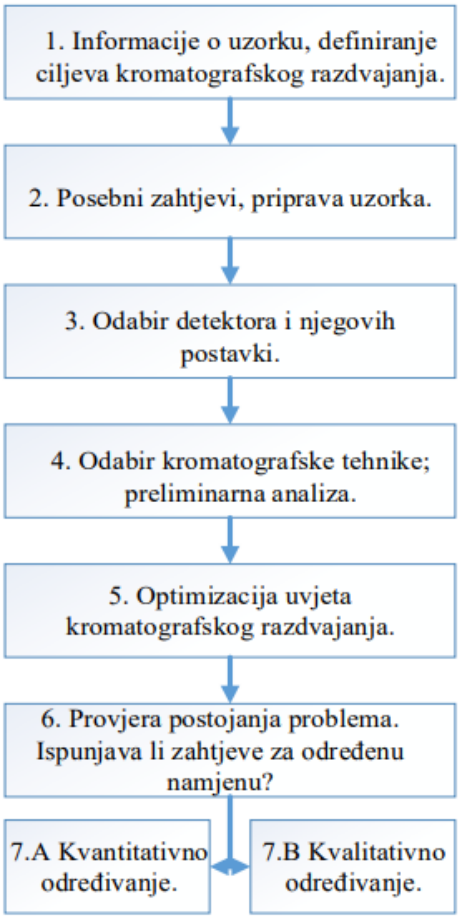
Slika 3.1: Podjela kromatografije

Preuzeto: 05.09.2020.

Izvor:https://www.scribd.com/document/382714871/05-Dario-Mandic-Uvod-u-Kromatografske-Separacije

Osnovni pojmovi koji se koriste u kromatografiji su analit, eluens, vrijeme zadržavanja analita u koloni (eng. *Rt – retention time*), kromatogram i kormatografski vrhovi (eng. *peak*). Analit je tvar koja se razdvaja u kromatografiji; eluens je komponenta sustava koja pokreće uzorak kroz stupac; vrijeme zadržavanja predstavlja vrijeme koje je potrebno da analit prođe kroz kromatografski sustav; kromatograf je instrument koji provodi kromatografiju; kromatogram je grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka gdje određeni vrh odgovara tvari, taj vrh nazivamo pik na kromatogram (Kosir, 2016.).

Prije nego što se krene u razvoj određene kromatografske metode potrebno je proći definirane korake kako bi se ispravno proveo postupak. Razvoj metode prikazan je slikom 3.2.



Slika 3.2: Shematski prikaz razvoja kromatografskih metoda (Kosir, 2016.)

Preuzeto: 04.09.2020.

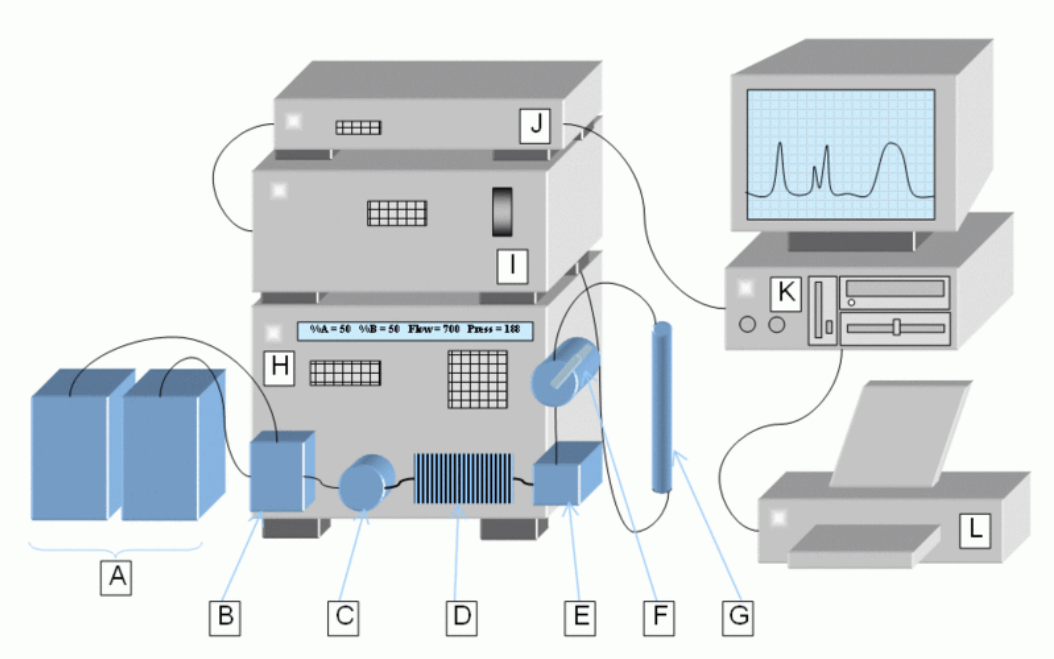
3.1.1 Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (eng. *Liquid Chromatography*, LC) je tehnika koja funkcionira na principu razdvajanja komponenti u kojoj je mobilna faza tekućina. Budući je tekućinska kromatografija metoda koja ima mogućnost detektirati i razlikovati ugljikohidrate, postala je referentna metoda u analizi laktoze u mlijeku. U primjeni tekućinske kromatografije nije nužno derivatizirati[4] ugljikohidrate. Tekućinskom kromatografijom moguće je odjeljivati smjese zbog svoje niske hlapljivosti i toplinske nestabilnosti, možemo ju podijeliti na adsorpcijsku, razdjelnu, ionsko-izmjenjivačku, isključnu i afinitetnu, kao što je prikazano na slici 3.1. Razlikujemo kromatografiju normalnih faza i obratnih faza. U kromatografiji normalnih faza nepokretna faza je polarna, a pokretna nepolarna, te se odjeljivanje analita temelji na interakciji polarne s nepolarnom fazom. U obrnutoj kromatografiji situacija je

[4] Derivatizacija ugljikohidrata predstavlja kemijsku pretvorbu u kojoj se sastojci uzorka prije ulaska u kromatografski stupac ili detektor obrađuju.

suprotna, temelji se na tome da je nepokretna faza nepolarna, a pokretna polarna, te se razdvajanje temelji na hidrofobnosti analita.

Tekućinsku kromatografiju još možemo razdijeliti na: tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC), kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UHPLC), ionsku kromatografiju (IC) i kromatografiju isključenjem po veličini (SEC)(Kaštelan, 2003.).
Slika 3.3. prikazuje skica uređaja za tekućinsku kromatografiju: A-rezervoar mobilne faze; B-ventil za miješanje i pumpa; C-*drain* ventil; D-uređaj za kontrolu tlaka; E-komora za miješanje (mikser); F-injektor; G-stupac; H-HPLC komponenta; I-detektor; J-kontroler; K-računalo; L-štampač.



Slika 3.3: Skica uređaja za tekućinsku kromatografiju

Preuzeto: 02.09.2020.

Izvor: https://hr.wikipedia.org/wiki/Kromatografija#/media/Datoteka:HPLC.gif

Današnja tekućinska kromatografija koja koristi male čestice za pakiranje kolone i visoki tlak naziva se tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti ili skraćeno **HPLC** (eng. *High Performance Liquid Cromatography*). HPLC je oblik kromatografije koji se najčešće koristi u analitičkoj kemiji. Funkcionira na način da tvar koju analiziramo prolazi kroz stupac odnosno cijev koja je punjena materijalom od sitnih čestica te je velike površine, tekućina se pumpa pod visokim tlakom kroz taj stupac. Zatim se mali volumen uzorka injektira u mobilnu fazu i putuje kolonom, punjenom stacionarnom fazom. Dolazi do različitih zadržavanja

komponenata smjese zbog specifičnih interakcija (kemijskih i fizičkih). Interakcija mobilne faze i samog uzorka sa stacionarnom fazom određuje brzinu eluiranja i separaciju molekula u uzorku, pa se komponente eluiraju s kolone različitom brzinom. Retencijsko vrijeme je vrijeme koje je potrebno da se tvar eluira i ono je specifično za određenu tvar. Koriste se uobičajena otapala poput vode, metanola ili organskih otapala. Razdvajanje molekula ovisi o primjeni mobilne i stacionarne faze odnosno jesu li one adekvatne, kao i brzini protoka mobilne faze kroz kolonu. Kod HPLC metode razlikujemo više metoda sa detektorima.

HPLC-RID odnosno *Refractive Indeks Detector* (RID) koju su razvili Silverira i sur. (2015.) smatra se jednom od najboljih metoda za određivanje laktoze u mlijeku jer RID može detektirati šećere koji inače ne mogu apsorbirati UV svijetlost ispod 200 nm i nema potrebe za derivatizacijom šećera. Njene su karakteristike jednostavnost, točnost, ponovljivost (reproducibilnost), osjetljivost, dobre separacijske mogućnosti, brzina i ekonomičnost.

Visoko djelotvorna anion-izmjenjivačka kromatografija (eng. *High Performance Anion-Exchange,* HPAE) je tehnika koja spada u tekućinsku kromatografiju te je razvijena kako bi se omogućilo razdvajanje ugljikohidrata. Pomoću PAD (pulsni amperometrijski detektor) postala je najpogodnija tehnika za određivanje ugljikohidrata jer za nju nije potrebno imati derivatizirane ugljikohidrate te mogu biti u veoma malim količinama s minimalnom količinom uzorka. HPAE je tehnika koju se koristi kako bi se odredili monosaharidi poput glukoze i fruktoze ili disaharidi poput laktoze, saharoze, maltoze itd.

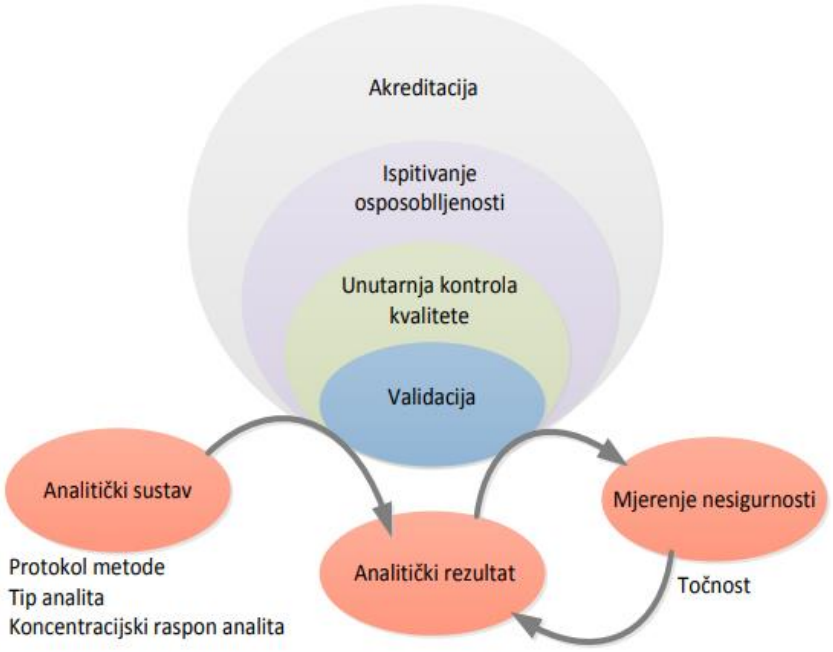
3.1.2 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (eng. *Gas Cromatography, GC*) je tehnika čijom je primjenom moguće odrediti ugljikohidrate poput glukoze i laktuloze, koja je raspadni produkt laktoze. Metoda se smatra veoma učinkovitom, ali mana joj je teška priprema uzoraka za analizu jer za razliku od prethodno spomenute metode, ovdje se ugljikohidrati moraju derivatizirati. Prema Kaštelanu (2003.) razlikujemo dvije tehnike u plinskoj kromatografiji: plinsko-adsorbcijsku i plinsko-tekućinsku. Prednost plinske kromatografije je mogućnost odjeljivanja veoma složenih smjesa, dok se nedostatkom smatra mogućnost odjeljivanja samo hlapljivih i toplinski stabilnih spojeva (Kaštelan, 2003.). Detektori kod plinske kromatografije: plameno ionizacijski za uzorke s dušikom, plameno-fotometrijski za uzorke sa fosforom ili sumporom, dušik-fosfor za uzorke koji sadrže dušik ili fosfor.

4. Osiguranje kvalitete u laboratoriju

Svakom analitičkom laboratoriju cilj je osigurati davanje točnih, brzih i pouzdanih rezultata prilikom ispitivanja. U analitičkom laboratoriju bitno je provoditi razna ispitivanja i kontrole kako bi se analize uzoraka provodile bez poteškoća i s valjanim rezultatima.
Postoje dva načina osiguranja kvalitete u laboratoriju, prvi je akreditacija dok je drugi dobra proizvođačka praksa. U oba slučaja zahtijevaju se valjani i stručni podaci. Kod akreditacije laboratorij zatraži od druge institucije, koja je odgovarajuća za tu ulogu, da ga pregleda i potvrdi njegovu osposobljenost. Dobra proizvođačka praksa podrazumijeva da laboratorij sam, uz odgovornost voditelja i glavnog analitičara, garantira kvalitetu rada. U oba navedena slučaja, prije svega potrebno je da sve metode budu validirane i/ili verificirane.

Slika 4.1. prikazuje različite razine osiguranja kvalitete koje laboratorij treba poduzeti kako bi postao i bio kompetentan za provođenje različitih analiza.



Slika 4.1: Različite razine osiguranja kvalitete u laboratorijima (Taverniers i sur., 2004.)
Preuzeto: 07.09.2020.

4.1. Validacija analitičkih metoda

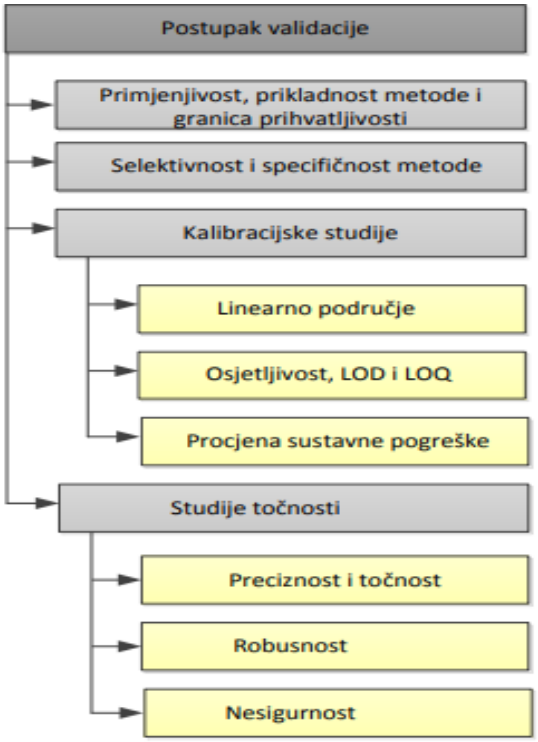
Poznato je da je validacija ključna u osiguranja kvalitete u analitičkim laboratorijima. *S*vaka analitička metoda koja je validirana u određenom laboratoriju daje tom laboratoriju kompetentnost i pouzdanost na tržištu, te pruža sigurnost pri davanju uzoraka na analitička ispitivanja. Validacija se provodi kada analitičar uvodi novu metodu koja je nepoznata i validacijom želi dokazati vjerodostojnost rezultata.
Slika 4.1 prikazuje razine osiguranja u laboratoriju prema Taverniers-u i sur. (2004.) gdje je također vidljivo kako se analitički sustav sastoji od protokola metode, tipa analita i koncentracijskog raspona analita. Validacija je potrebna kako si se dokazalo da taj analitički sustav odgovara dobivenom analitičkom rezultatu s određenom točnošću.

Validacija se definira kao postupak dokazivanja prikladnosti metode za točno određenu namjenu (Mikulec i sur., 2004.) Prema mjeriteljskom rječniku validacija nekog elementa je osiguravanje objektivnih dokaza da taj element udovoljava zahtjevima koji su prikladni za neku jasno utvrđenu uporabu. Potrebna je kako bi se potvrdilo da je određena analitička metoda prikladna za provedbu i kako bi se dobili rezultati s prihvatljivom razinom nesigurnosti. Validacija također služi kako bi se njome utvrdili mogući uzroci problema koji bi se javili tijekom izvođenja metode, te se time postiže visok stupanj pouzdanosti metode.
Prije provođenja sustava validacije potrebno je ispuniti određene uvijete poput: definirati problem i plan, utvrditi bitne validacijske parametre, mjerenje i obrada podataka, utvrđivanje kriterija prihvatljivosti, izrada dokumentacije, izjava zadovoljava li metoda svoju svrhu.

Validacija se provodi kada se:

- Uvodi nova metoda
- Mijenja bilo koji dio metode koja je već bila validirana
- Postojeća metoda prenamjenjuje
- Dogode promjene u analitičkom postupku
- Analitička metoda prenosi u drugi laboratorij
- Analitička metoda prenosi na drugi instrument
- Postojeća analitička metoda poboljšava ili prilagođava

Slika 4.2 prikazuje podjelu postupka validacije. Validacija metoda se jako brzo razvila tijekom posljednjih pedesetak godina, od jednog zanemarenog područja mnogih znanstvenih disciplina, do široko priznatog procesa koji se koristi za potvrdu analitičkih postupaka te njihove prikladnosti za namijenjenu uporabu (Araujo, 2009). Validacijom se ne mogu predvidjeti svi problemi koji se mogu dogoditi prilikom uporabe metode, razvojem metode i validacijom metode ukazuje se na one najčešće.



Slika 4.2: Postupak validacije metode (Gonzalez i Herrador, 2007.)
Preuzeto: 05.09.2020.

4.1.1 Parametri validacije

Prema Taverniers-u i sur. (2004.) parametri validacije su:

- Selektivnost/ specifičnost
- Linearnost
- Područje
- Preciznost: Ponovljivost, intermedijarna preciznost i obnovljivost
- Točnost
- Granica detekcije
- Granica kvantifikacije
- Robusnost

Selektivnost metode predstavlja točnost mjerenja metode u prisutnosti različitih smetnji kao na primjer mikroorganizmi, nečistoće. Razlika između selektivnosti i specifičnosti je jedino ta što se specifičnost upotrebljava za metode koje daju rješenje za samo jedan analizirani analit, dok selektivnost predstavlja metodu koja daje odgovore na više analiziranih analita koji se mogu, a i ne moraju razlikovati jedan od drugoga. S obzirom da je veoma malen broj analitičkih metoda koje se koriste samo za jedan analit, većinom se u praksi primjenjuje pojam selektivnosti. Prilikom odvijanja kromatografskih metoda bilo bi poželjno procijeniti čistoću kromatografskih vrhova/pikova jer je kod tih metoda teško sa sigurnošću reći jesu li dobiveni pikovi prikaz ciljanog analita ili su moguće i prisutnosti nečistoća (Huber, 2011.). Načini određivanja selektivnosti: identifikacija (usporedba uzoraka i matriksa s referencijskim materijalom) i sadržaj i onečišćenja (analit se cijepi očekivanim onečišćenjima u očekivanim i dozvoljenim koncentracijama) (HMD, 2006.). Prilikom prikaza rezultata u obzir se uzimaju dokazi o čistoći kromatografskog vrha.

Radno područje je interval između najniže i najviše koncentracije analita u uzorku za koji možemo reći da metoda ima zadovoljavajuću razinu preciznosti, točnosti i linearnosti (ICH, 2005.) Radno područje se izvodi iz linearnosti i izražava se u istim jedinicama kao i rezultat metode (HMD 2006.).

Linearnost je pojam koji predstavlja direktnu proporcionalnost dobivenih rezultata i količine analita u uzorku unutar definiranog područja metode. Linearnost određujemo na minimalno 5 koncentracija u rasponu od 80 do 120% od očekivane koncentracije analita u uzorku uz minimalno 3 ponavljanja (Ajerdini, 2012.). Kako bi se dokazala linearnost potrebno je iskazati koeficijent korelacije (CV: relativna standardna devijacija- RSD), odsječak na y-osi, nagib regresijskog pravca i zbroj kvadrata odstupanja te uz navedeno priložiti grafički prikaz. Koeficijent korelacije mora biti veći od 0,999 kako bi se kriterij prihvatljivosti smatrao zadovoljavajući.

Preciznost analitičke metode predstavlja stupanj slaganja između neovisnih rezultata mjerenja koji su dobiveni pod određenim uvjetima. Njome se na način da na homogeniziranom autentičnom uzorku napravi 5-6 određivanja u 2-3 koncentracije, određuje slučajna pogreška metode. Rezultati se mogu prikazati kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija i raspon pouzdanosti srednje vrijednosti. Za određivanje sadržaja u prehrambenim i ekološkim uzorcima uzima se granica RSD(%) 2-20% (HMD 2006.).
Ponovljivost je preciznost pod istim uvjetima. Isti uvjeti podrazumijevaju istog analitičara, istu aparaturu, isti laboratorij u kratkom vremenskom razmaku.

Točnost predstavlja podudaranje između stvarne tj. prihvaćene vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj ponavljanja. Kao parametar validacije točnost se mora odrediti u barem 3 koncentracije uzorka gdje rasponi koncentracija moraju odgovarati stvarnom uzorku, ali se trebaju i nalaziti blizu koncentracije granice kvantifikacije. Rezultati se prikazuju grafički prema izmjerenoj koncentraciji.

Granica kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati ili kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost (HMD, 2006.). Prema IUPAC-u **granica detekcije** je najmanja koncentracija analita koji je značajno veći od signala koji potječe od slijepe probe. To je statistička vrijednost kojom se opisuje najmanji iznos analita koji se može mjeriti.

Robusnost predstavlja otpornost analitičkog postupka na male i nenamjerne promjene parametara metode (HMD, 2006.). Ispitivanjem robusnosti određuje se učinak parametara na analizirane rezultate. Može se nazvati i kao osjetljivost metode.

4.1.2 Mjerna nesigurnost

Mjerna nesigurnost ukazuje na raspon u kojemu će se s određenom vjerojatnošću nalaziti prava vrijednost uzorka. Svaki laboratorij mora znati nesigurnost svih svojih kvantitativnih rezultata. Razlikujemo dvije osnovne kategorije koje čine nesigurnost u rezultatu mjerenja: odredive i neodredive. Mjerna nesigurnost predstavlja točnost izvođenja procesa mjerenja. Postoje čimbenici koji mogu utjecati na izvor nesigurnosti mjerenja:

- Veličina koja se mjeri nije potpuno definirana
- Vanjski utjecaji poput temperature, vlažnosti, tlaka
- Osjetljivost instrumenata na buku ili temperaturu
- Nespretnost izvođača odnosno analitičara

5. Materijali i metode

5.1. Validacija HPLC-RID metode

U validaciju ubrajamo parametre linearnosti, mjerne ponovljivosti, preciznosti, obnovljivosti, mjerne istinitosti, selektivnosti, granica detekcije, granica kvantifikacije i robusnost. Važno je napomenuti da za svaku uporabu metode nije potrebno ispitati sve parametre već samo one koji su važni za ispravnu provedbu analiza u nekom laboratoriju.
U ovom radu provedena je valjana validacija, odnosno određivani su sljedeći, ključni parametri validacije: linearnost, iskorištenje, preciznost odnosno ponovljivost i granica kvantifikacije.
Validirana je HPLC- RID metoda, koja je ranije opisana u poglavlju 2.
Tablica 5.1 prikazuje kriterije prihvatljivosti parametara za validaciju metode HPLC-RID tehnikom za određivanje laktoze.

Tablica 5.1. Parametri validacije i kriterij prihvatljivosti za HPLC-RID metodu

Linearnost	Iskorištenje	Preciznost: Ponovljivost pripreme uzroka (RSD)	Granica kvantifikacije
k ≥ 0,999	100 ± 10%	RSD ≤ 5%	Informacija

Za postupak provedbe validacije metode korišten je slijedeći pribor, oprema i reagensi:

Pribor, oprema i kemikalije

1. Omjerna tikvica od 25 mL
2. Standard SIGMA-ALDRICH Lactose Anhydrous 99,6%
   m(st)=0,12548g
3. Acetonitril, visoke čistoće
4. Redestilirana voda

<u>Priprema standarda za analizu</u>
Za pripremu standarda bilo je potrebno u odmjernu tikvicu od 25 mL odvagati 0,12548 grama standarda na analitičkoj vagi, te potom otopiti u 12,5 mL demineralizirane vode. Tikvica se zatim nadopunila do oznake sa acetonitrilom.

c(laktoze)=$\frac{0,125489}{25mL}$ x 0,996
c(laktoze)= 5.0 g/L

Razrjeđenje se postiže mijenjanjem volumena injektiranja na kromatografu.

Koncentracija laktoze 1: 10 g/L → 40 µL
Koncentracija laktoze 2: 7,5g/L → 30 µL
Koncentracija laktoze 3: 5g/L → 20 µL – volumen injektiranja
Koncentracija laktoze 4: 3,75g/L → 15 µL
Koncentracija laktoze 5: 2,5g/L → 10 µL
Koncentracija laktoze 6: 1g/L → 4 µL
Koncentracija laktoze 7: 0,35g/L → 20 µL -standard 1

Za L7 korišten je drugi standard jer je najniža točka te ujedno i granica kvantifikacije.

5g/L = $\frac{0{,}350mL\ (350\mu m)}{5mL}$ = 0,35g/L → standard 1

L1-L6 su snimljeni iz STOCK-a mijenjajući volumen injektiranja aparata. L7 je snimljen iz standarda 1.
Svi uzorci se snimaju tako da je volumen injektiran konstantan a iznosi 20 µm.

5.2. Materijali i metode- uzorci mlijeka

Principom slučajnog odabira iz maloprodajne mreže uzorkovano je ukupno 30 uzoraka mlijeka (n=30) koji su se pripremili u laboratoriju te analizirali tehnikom HPLC-RID kromatografijom. Svi uzorci su dopremljeni u Laboratorij za kemijske analize hrane, Odjela za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe, Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar". Vrijednosti laktoze na svim nasumično uzetim uzorcima navedene su na deklaraciji proizvoda, s kojima su potom uspoređeni rezultati dobiveni u ovom istraživanju.

Za postupak provedbe istraživanja korišten je slijedeći pribor, oprema i reagensi.

Pribor, oprema i kemikalije

1. odmjerna tikvica od 50 mL
2. redestilirana voda
3. acetonitril, visoke čistoće
4. filter
5. bočica za uzorkivač

Priprema uzoraka za analizu
Za pripremu uzorka bilo je potrebno u odmjernu tikvicu od 50 mL odvagati 5 grama homogeniziranog uzorka na analitičkoj vagi, te potom otopio u 25 mL demineralizirane vode. Tikvica se zatim nadopunila do oznake sa acetonitrilom i pripremljeni uzorak profiltrirao kroz 0,45 µm filtera u bočicu za uzorkivač (eng. *vial*). Uzorak se zatim stavio u prethodno

pripremljen instrument za kromatografsku analizu. Tablica 5.2. prikazuje koji su uvjeti morali biti zadovoljeni kako bi se provela pravilna analiza uzoraka.

Tablica 5.2. Uvjeti rada kromatografa

mobilna faza	acetonitril:voda (75 : 25 V/V)
protok mobilne faze	0,5 mL/min
Temperatura	40ºC
Detektor	RI detektor
volumen analiziranog uzorka	konstantan – 20 µL
vrijeme eluiranja	30 min.
Kolona	Shodex Asahipak-NH2P, 250 x 4,5 mm, 5µm

Prisutnost laktoze u otopini uzorka utvrđuje se usporedbom retencijskih vremena analita koji se nalaze u uzorku s referentnom tvari, odnosno standardom.

Količine traženih analita u uzorku utvrđuju se metodom vanjskog standarda koristeći kalibracijski pravac. Da bi se pripremio kalibracijski pravac potrebno je odrediti površinu kromatografskih vrhova (pikova) za minimalno 5 različitih koncentracija laktoze.

6. Rezultati i rasprava

U ovom radu provedena je validacija HPLC-RID tehnike za određivanje laktoze u mlijeku. Kao parametri validacije korišteni su: linearnost, iskorištenje, ponovljivost i granica kvantifikacije.

6.1. Validacija metode

6.1.1. Linearnost

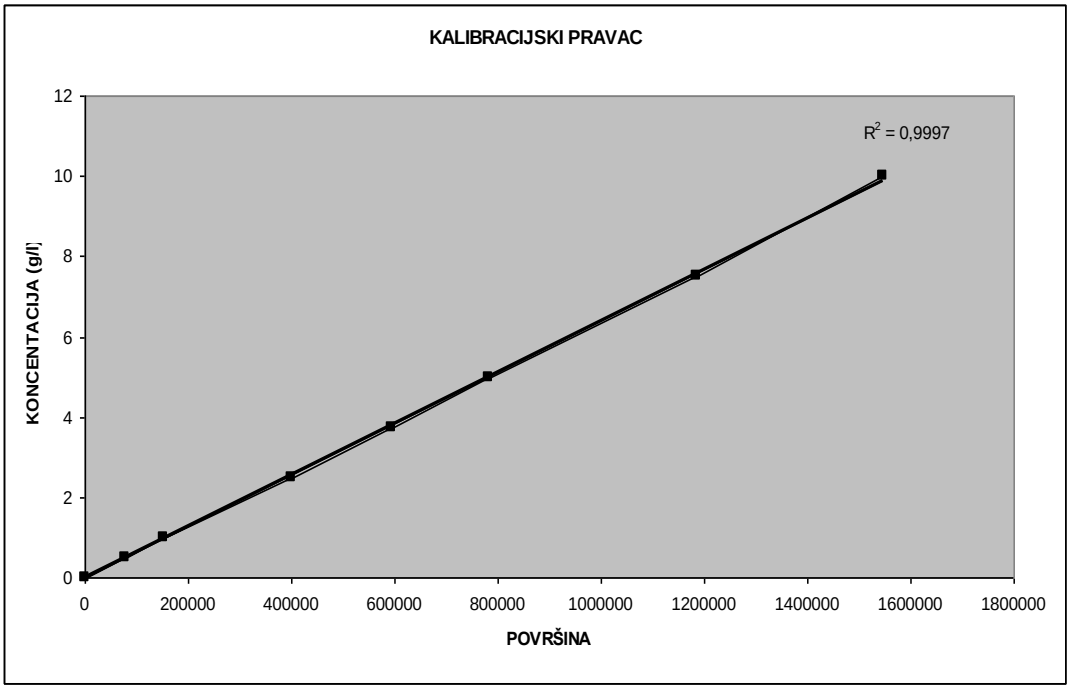
U tablici 6.1 nalazi se rezultati ispitivanja linearnosti za laktozu, na slici 6.1. nalazi se grafički prikaz ovisnosti površine kromatografskog vrha/pika o koncentraciji laktoze.
Za analizu linearnosti odziva detektora pripremljeno je 7 (min. ≥4) koncentracija standarda laktoze u području metode i injektirano što je prikazano u tablici 6.1 određena je jednadžba regresijskog pravca, nagib, odsječak i koeficijent korelacije.

Područje linearnosti metode iznosi 0,35-10,0 g L^{-1} (0,35-10,0 g/100g)

Tablica 6.1.. Rezultati linearnosti za laktozu

KONCENTRACIJA g L^{-1}	Površina ispod kromatografskog vrha (eng. *area*)
10	1546339
7,5	1184046
5	781320
3,75	594368
2,5	400531
1	151563
0,35	60213

Za određivanje kalibracijskog pravca prikazanog na slici 6.2, uzete su koncentracije iz tablice 6.1 te su im pridodane površine ispod kromatografskog vrha.
Raspon koncentracija u kojem su Chávez-Servin i sur. (2004.) određivali linearnost metode za laktozu je od 0,2g/100mL do 1,5 g/100mL, Ferreira i sur. (1998.) od 0,05 do 3g/100mL, a Xinmin i sur. (2003.) od 0,1 do 2 g/100mL.



Slika 6.1: Kalibracijski pravac za laktozu

6.1.2. Iskorištenje (eng. *Recovery*)

U tablici 6.2 nalaze se podaci o ispitivanju iskorištenja pri određivanju laktoze. Rezultati u tablici 6.2 ukazuju da je postotak iskorištenja u rasponu od 95,6% do 98,2%, što ukazuje na vrlo zadovoljavajuće rezultate i visoki postotak iskorištenja metodologije. Srednja vrijednost uzoraka je 97,7% što ulazi u kriterij prihvatljivosti za HPLC-RID tehniku (tablica 5.1).

Srednja vrijednost za iskorištenje u ovom istraživanu iznosi 97,7% dok srednje iskorištenje za laktozu koje su Chávez-Servin i sur. (2004.) utvrdili u svom istraživanju iznosi 101,5 % , a Xinmin i sur. (2003.) vrlo slično ovom istraživanju, od 97,6 %.

Tablica 6.2. Rezultati iskorištenja metode

Dodane koncentracije laktoze (g/100g)	Koncentracija-izmjerena (g/100g)	Odvaga (g)	Iskorištenje (eng. *recovery*) (%)
1	4,737	5,0022	98,2
	4,729		
	4,735		
srednja vrijednost $\bar{x}$	4,734		
γ (g/100 g)	4,732		
2	5,646	5,0064	97,3
	5,728		
	5,719		
srednja vrijednost $\bar{x}$	5,698		
γ (g/100 g)	5,690		
3	6,762	5,0032	99,6
	6,749		
	6,705		
srednja vrijednost $\bar{x}$	6,739		
γ (g/100 g)	6,734		
4	8,722	5,0012	95,6
	8,489		
	8,385		
srednja vrijednost $\bar{x}$	8,532		
γ (g/100 g)	8,530		
srednja vrijednost (%)			97,7

$\bar{x}$ predstavlja srednju vrijednost od 3 mjerenja, a γ standardnu devijaciju

6.1.3. Ponovljivost

U tablici 6.3 prikazani su rezultati ispitivanja ponovljivosti mjerenja. Ponovljivost predstavlja preciznost pod uvjetima ponovljivosti kao što su isti analitičar, isti uzorak, isti mjerni sustav, isti radni uvjeti i kratko vremensko razdoblje.
Ponovljivost pripreme uzoraka ispitana je pripremom istog uzorka mlijeka. Isti uzorak mlijeka pripremljen je 5x te je ispitana ponovljivost uzorka i izračunata srednja vrijednost i RSD. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6.3.

Srednja vrijednost koncentracije laktoze svih 5 uzoraka standarda iznosila je 3,752 g L^{-1}, te je RSD iznosio 1,55% što ulazi u kriterij prihvatljivosti za HPLC-RID metodu prikazanu u tablici 6.3.
Relativna standardna devijacija površine pika laktoze utvrđena od strane Chávez-Servin i sur. (2004.) iznosi 0,46 %, a od strane Xinmin i sur. (2003.) 1,06 %.

Tablica 6.3: Rezultati ispitivanja ponovljivosti pripreme uzorka

Uzorak br.	Koncentracija (g/100g)	Srednja vrijednost	Masa	γ (g/100g)
1	3,810			
	3,826			
	3,786			
		3,807	5,0106	3,80
2	3,754			
	3,741			
	3,811			
		3,769	5,0136	3,76
3	3,656			
	3,698			
	3,625			
		3,660	5,0002	3,66
4	3,705			
	3,689			
	3,776			
		3,723	5,0090	3,72
5	3,861			
	3,757			
	3,786			
		3,801	5,0126	3,79
Srednja vrijednost $\bar{x}$		3,752		3,74
Standardna devijacija				0,057935
RSD (%)				1,55

6.1.4. Granica kvantifikacije

Tablica 6.4 predstavlja najniže koncentracije uzoraka koje su bile potrebne da bi se laktoza kao ciljani analit odredila u ispitivanom uzorku. Granica kvantifikacije određena je kao najniža koncentracija traženog analita (laktoze) koji detektor može kvantificirati sa zadovoljavajućom ponovljivošću -RSD ≤ 5 %. Ponovljivost na granici kvantifikacija izračunata je iz rezultata najmanje deset uzastopnih mjerenja.
RSD iznosio je 1,87% što je u skladu sa kriterijem prihvatljivosti prikazanim u tablici 5.1.

Tablica 6.4. Rezultati ispitivanja granice kvantifikacije za metodu

Redni Broj	Koncentracija
1	0,360
2	0,366
3	0,360
4	0,359
5	0,358
6	0,352
7	0,343
9	0,356
10	0,366
Sr.vrij.	0,358
St.dev.	0,006684
RSD %	1,87

Schuster-Wolff-Buhring, Michel i Hinrichs (2011.) ustanovili su metodu za određivanje laktoze pomoću HPLC-ELSD. ELSD ili detektor za raspršivanje svjetlosti je detektor koji se koristi zajedno sa tekućinskom kromatografijom visokih performansi. Njegova kvaliteta je sposobnost da detektira sve sastojke koje su manje promjenjive u mobilnoj fazi. Granica detekcije iznos 0,38 g L^{-1} ,dok u ovom istraživanju iznosi 0,35 g L^{-1}.
Fusch i sur. (2011.) odredili su udio laktoze u sirovom mlijeku koristeći HPLC u kombinaciji sa masenom spektroskopijom koja ionizira kemijske spojeve i razdvaja ione na temelju njihovog omjera masa. Vrijeme detekcije iznosilo je 5 minuta i granica detekcija bila je manja od
5 x 10^{-3} mg L^{-1}.
Terol i sur. (2012.) koristili su su tekućinsku kromatografiju u kombinaciji sa ELS detektorom kako bi precizno i brzo odredili ugljikohidrate u različitom mlijeku. U njihovoj metodi granica kvantifikacije iznosila je između 2.0 i 4.7 mg L^{-1}.

Tablica 6.5 prikazuje usporedbu zadanih kriterija prihvatljivosti parametara validacije i dobivene rezultate.

Tablica 6.5. Kriteriji prihvatljivosti i dobiveni rezultati

Parametar	Dobiveni rezultati	Kriterij prihvatljivosti
Linearnost	k=0,9997	k≥0,999
Iskorištenje	97,7	100±10%
Preciznost:		
ponovljivost pripreme uzorka (RSD)	1,55%	RSD≤5%
Granica kvantifikacije	0,35 g L^{-1} (0,35 g / 100 g)	Informacija

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tablici možemo zaključiti da je metoda prikladna za određivanje udjela laktoze u proizvodima. Nakon provođenja postupka validacije metode s standardom laktoze, provedena je analiza udjela laktoze u uzorcima konzumnog mlijeka.

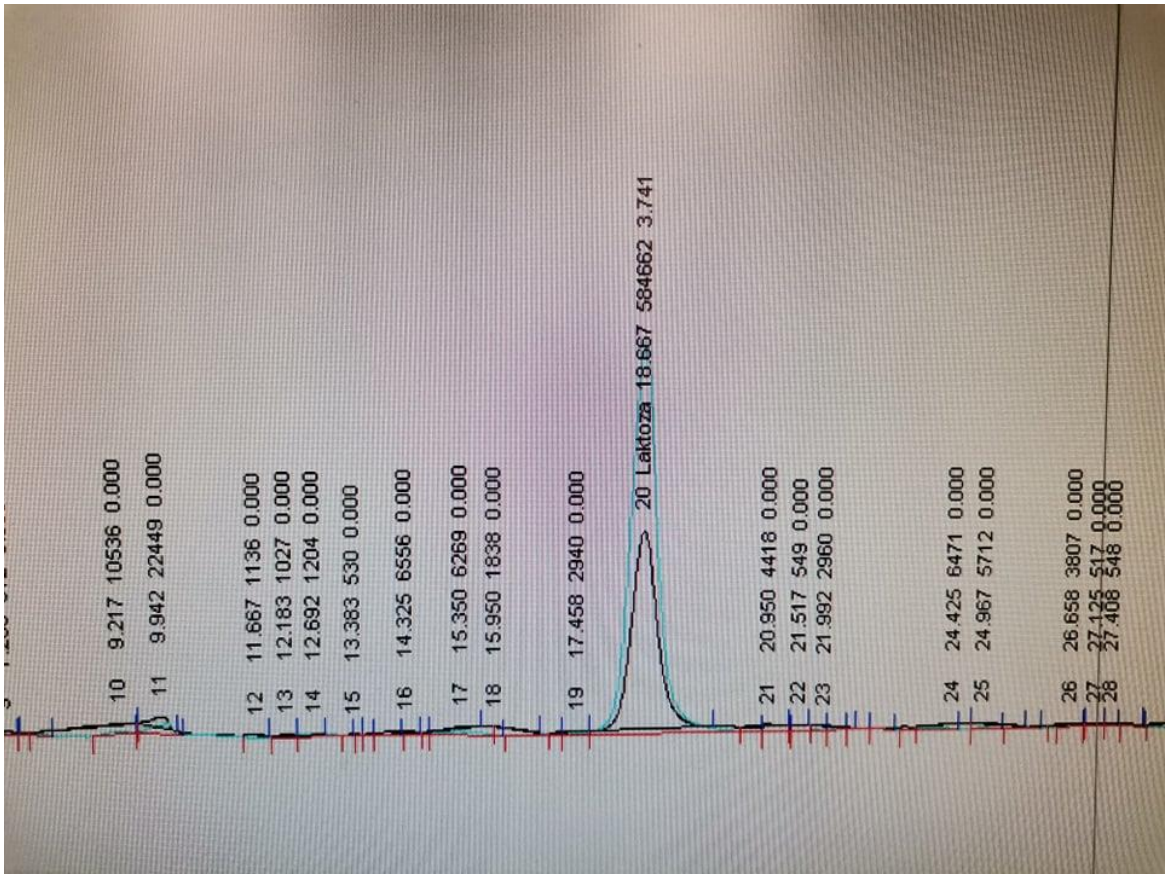
6.2. Rezultati određivanja udjela laktoze u uzorcima mlijeka

Određivanje laktoze u mlijeku vrlo je bitno jer njezin udio utječe na ekonomsku vrijednost mlijeka i financijsku dobit, budući se kvaliteta mlijeka određuje na osnovu nutritivne vrijednosti/sastava.

Neposredno prije prikaza rezultata određivanja udjela laktoze u mlijeku na slici 6.2 prikazan je kromatogram na kojemu je standard uzorka označen zelenom bojom, te je vidljiv kromatografski vrh za uzorak laktoze označen crnom bojom.

Koncentracija standarda iznosi 5g/100g, a ispitivanog uzorka laktoze 3,741 g/100g.

Površina ispod kromatografskog vrha za uzorak ispitivanja laktoze iznosi 584662.



Slika 6.2. Kromatogrami standarda uzorka i uzorka mlijeka

Površina kromatografskog vrha/pika (x) za svaki uzorak se izračunava tako da iz tablice za linearnost (6.1.) uzima površina ispod kromatografskog vrha i koncentraciju, u ovom slučaju koncentraciju 5 g L^{-1} i površinu 781320 jer se sve vrijednosti laktoze u uzorcima mlijeka kreću oko te koncentracije.

Jednadžba za izračunavanje površine ispod kromatografskog vrha glasi:

$$X=\frac{781320 x koncentracija\ laktoze\ sa\ kromatograma}{5}$$

Tablica 6.6.,6.7 i 6.8. prikazuju dobivene površine ispod kromatografskog vrha za uzorke (svježeg), sirovog nehomogeniziranog i UHT (trajnog) mlijeka.

Tablica 6.6. Površine ispod kromatografskog vrha za uzorke pasteriziranog mlijeka

Uzorak	Površina (eng. *area*)	Koncentracija laktoze
1	683655	4,375
2	700531	4,483
3	761943	4,876
4	766943	4,908
5	766787	4,907
6	680373	4,354
7	709907	4,543
8	629743	4,030
9	734440	4,700
10	709438	4,540

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 6.6 vidljivo je da se koncentracija laktoze u različitim uzorcima pasteriziranog mlijeka nabavljenih iz maloprodajne mreže kretala od 4.03-4.908. Iniguez i Gomez (1988.) su u ispitivanju 300 uzoraka pasteriziranog mlijeka ustanovili 4,55% laktoze što odgovara i rezultatima ovog istraživanja.

Tablica 6.7. Površina ispod kromatografskog vrha za uzorke sirovog nehomogeniziranog mlijeka

Uzorak	Površina (eng.*area*)	Kocentracija laktoze
1	768975	4,921
2	684592	4,381
3	834293	5,339
4	714439	4,572
5	835387	5,346
6	646932	4,140
7	743504	4,758
8	775694	4,964
9	811635	5,194
10	898361	5,749

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 6.7. prikazano je da se laktoze u različitim uzorcima sirovog nehomogeniziranog mlijeka kretala od 4,14-5,74 g/100g.
U istraživanju prema Bylundu (2003.) prosječni udio laktoze u mlijeku iznosi 4,8% što je sukladno rezultatima u ovom istraživanju.

Tablica 6.8. Površina ispod kromatografskog vrha za uzorke UHT (trajno) mlijeka

Uzorak	Površina (eng.*area*)	Kocentracija laktoze
1	842262	5,39
2	695374	4,45
3	662559	4,24
4	734440	4,70
5	718814	4,60
6	718814	4,60
7	562550	3,60
8	609429	3,90
9	589115	4,77
10	818823	5,24

Rezultati u tablici 6.8 prikazuju da se koncentracija laktoze kreće od 3,60-5,39 g/100g.

Određivanje laktoze u mlijeku, prema Dionexu (2011.), provedeno je HPLC metodom sa CAD (eng. *Charged Aerosol Detector*). Određivanje laktoze uključivalo je 1:100 razrijeđenje mlijeka, metoda je prije determinacije mlijeka validirana te su u validaciju uključeni parametri linearnosti, preciznosti, točnosti i osjetljivosti metode. Uzorak mlijeka je razrijeđen sa između sa redestiliranom vodom (0,5-5,0 mL), te nakon razrjeđenja vodom otopina je razrijeđena 70%-tnim acetonitrilom i na kraju provedeni kroz filter. Istraživanje je pokazalo da je metoda pogodna i precizna za određivanje laktoze u mlijeku.

Smatra se da mlijeko koje sadrži manje od 4,5% laktoze potječe iz bolesnog vimena, zahvaćenog upalnim procesom. Na taj način kroz mliječnu žlijezdu protječe manja količina krvi, a s njom i manja količina glukoze koja je jedan od prekursora u sintezi laktoze (Antunac i sur., 1997.).

Euber i Brunnen (1979.) su također za razrjeđenje uzorka koristili acetonitril i redestiliranu vodu u omjeru 70:30. U istraživanju su koristili konzumno mlijeko iz maloprodajne mreže. Rezultati su ukazali da određivanje laktoze HPLC tehnikom ovisi o više faktora:

1) izoliranje laktoze i uklanjanje suvišnih komponenti
2) separacija i određivanje laktoze HPLC metodom
3) precizno kvantitativno određivanje laktoze

Odvajanje i determinacija laktoze pomoću HPLC metode sa RI detektorom se i u ovom istraživanju prikazala kao ispravna i pouzdana metoda za određivanje laktoze.

Tablica 6.9. Rezultati ispitivanja sadržaja laktoze u uzorcima svježeg (pasteriziranog) mlijeka

Redni broj	Opis uzorka (deklarirani podatci)	Rezultati (g/100 ml)	Napomena
1.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Slovenija Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 3.5%	Udio šećera: 4,37	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
2.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 3.2%	Udio šećera: 4,48	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
3.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6 g Sadržaj mliječne masti: 3.2%	Udio šećera: 4,87	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
4.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 1.5%	Udio šećera: 4,90	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
5.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 3.2°%	Udio šećera: 4,90	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
6.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti 3.2%:	Udio šećera: 4,35	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
7.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 3.2%	Udio šećera: 4,54	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
8.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7g Sadržaj mliječne masti: 3,2%	Udio šećera: 4,03	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
9.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,7 Sadržaj mliječne masti:. 3,2%	Udio šećera: 4,70	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
10.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6 Sadržaj mliječne masti: 3,2%	Udio šećera: 4,54	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011

Tablica 6.10. Rezultati ispitivanja sadržaja laktoze u uzorcima UHT (trajnog) mlijeka

Redni broj	Opis uzorka	Rezultati (g/100 ml)	Napomena
1.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 2.8%	Udio šećera: 5,39	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
2.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 2.8%	Udio šećera: 4,45	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
3.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,4g Sadržaj mliječne masti: 2.8%	Udio šećera: 4,24	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
4.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 3,8%	Udio šećera: 4,7	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
5.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 3,8%	Udio šećera: 4,6	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
6.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 3,8%	Udio šećera: 4,6	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
7.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera:4,6g Sadržaj mliječne masti: 1,5%	Udio šećera: 4,5	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
8.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 2,8%	Udio šećera: 3,9	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
9.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 2,8%	Udio šećera: 4,77	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
10.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,6g Sadržaj mliječne masti: 2,8%	Udio šećera: 5,24	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011

Tablica 6.11: Rezultati ispitivanja sadržaja laktoze u uzorcima sirovog mlijeka

Redni broj	Opis uzorka	Rezultati (g/100 ml)	Napomena
1.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,61 Sadržaj mliječne masti: 4,00%	Udio laktoze: 4,92	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
2.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,73 Sadržaj mliječne masti: 3,91%	Udio laktoze: 4,38	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
3.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,89 Sadržaj mliječne masti: 3,66%	Udio laktoze: 5,33	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
4.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,62 Sadržaj mliječne masti: 4,98%	Udio laktoze: 4,57	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
5.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,40 Sadržaj mliječne masti: 3,77%	Udio laktoze: 4,75	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
6.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera:4,82 Sadržaj mliječne masti:2,69%	Udio laktoze: 4,94	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
7.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,75 Sadržaj mliječne masti: 3,07 %	Udio laktoze: 4,75	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
8.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,58 Sadržaj mliječne masti: 3,54%	Udio laktoze: 4,96	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
9.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,20 Sadržaj mliječne masti: 6,35%	Udio laktoze:4,78	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011
10.	Neto: 1L Zemlja podrijetla: Hrvatska Udio šećera: 4,65 Sadržaj mliječne masti: 2,65%	Udio laktoze: 4,92	Sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011

U tablici 6.9 prikazan je udio laktoze s deklaracije proizvoda, te rezultati proizašli u ovom istraživanju. Dobiveni udio laktoze u uzorcima svježeg (pasteriziranog) mlijeka nije značajno odstupao od navedenog udjela s deklaracije. U 6 uzoraka mlijeka utvrđena je neznatno niža vrijednost od deklarirane vrijednosti, u 3 uzoraka utvrđen je neznatno viši udio laktoze od deklarirane vrijednosti, dok je 1 uzorak imao istu vrijednost kao na deklaraciji proizvoda. Najveće odstupanje od deklaracije zamjećuje se kod uzorka br. 8 gdje je utvrđeno 0,67 grama manje nego što je navedeno na deklaraciji.

U tablici 6.10 prikazani su rezultati udjela laktoze u UHT mlijeku, gdje se uočava blago veći udio laktoze s obzirom na vrijednost navedenu na deklaraciji. U 4 uzoraka mlijeka utvrđena je neznatno niža vrijednost od deklarirane vrijednosti, u 4 uzoraka utvrđen je neznatno viši udio laktoze od deklarirane vrijednosti, dok su 2 uzorka imala istu vrijednost kao na deklaraciji proizvoda. Rezultati za sve uzorke UHT (trajnog) mlijeka sukladni vrijednostima navedenim na deklaraciji.

Tablica 6.11 prikazuje rezultate analize sadržaja laktoze za sirovo nehomogenizirano mlijeko. Rezultati za sirovo mlijeko uspoređeni su sa rezultatima analiza provedenim u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta (RL). Sadržaj laktoze određen je infra-red metodom na instrumentu Milcoscan FT 120 (Foss, Danska). U 2 uzoraka mlijeka utvrđena je neznatno niža vrijednost od vrijednosti utvrđene instrumentalnom infra-crvenom metodom, u 7 uzoraka utvrđen je neznatno viši udio laktoze, dok je 1 uzorak imao istu vrijednost kao i prilikom određivanja laktoze u RL-u.

Iako su vrijednosti za udio laktoze varirale u sve tri skupine mlijeka (sirovo, pasterizirano i sterilizirano), najveća odstupanja uočavaju se za uzorke sirovog mlijeka. Kod uzoraka UHT (trajnog) mlijeka odnosno pasteriziranog mlijeka rezultati su sukladni vrijednostima koje su navedene na deklaraciji. Dobivena odstupanja u skladu su s dozvoljenim odstupanjima koja propisuje Uredba (EU) br. 1169/2011.

7. Zaključak

U ovom radu razvijena je i validirana HPLC-RID metoda za određivanje ugljikohidrata u mlijeku, odnosno laktoze u pasteriziranom, steriliziranom i nehomogeniziranom sirovom mlijeku. Određen je udio laktoze u 20 uzoraka toplinski obrađenog mlijeka i uspoređen je sa udjelom koji je naveden na deklaraciji proizvoda. Udio laktoze u sirovom mlijeku uspoređen je sa rezultatima određenim infra-crvenom metodom na instrumentu Milcoscan FT 120 (Foss, Danska).

S obzirom na dobivene rezultate iz ovog rada može se zaključiti:

- HPLC-RID metoda je jednostavna, brza i ekonomična metoda, te se pokazala prikladnom i pouzdanom za rutinsko određivanje laktoze u mlijeku.

- Ključni parametri pri validaciji ove metode bili su linearnost, iskorištenje, ponovljivost i granica kvantifikacije.

- Metoda zadovoljava kriterij linearnosti u ispitivanom području uz koeficijent korelacije koji iznosi 0,9997.

- Vrijednost relativne standardne devijacije za ponovljivost mjerenja ne prelazi 5% što dokazuje da je metoda precizna, te udovoljava zadanim kriterijima prihvatljivosti sukladno zahtjevima norme HRN 22662:2010.

- Postignuto je iskorištenje u rasponu od 95,6% do 99,6% čime se potvrđuje točnost metode.

- Vrijednostima za granicu kvantifikacije dokazano je da je metoda osjetljiva za određivanje niskih vrijednosti udjela laktoze u mlijeku. Najmanja koncentracija za udio laktoze HPLC-RID metodom iznosi 0,35 g/100mL.

- Na temelju svih prikazanih parametara validacije možemo zaključiti da je HPLC-RID metoda prikladna za rutinsko određivanje laktoze u uzorcima mlijeka.

- Na temelju dobivenih rezultata udjela laktoze u uzorcima konzumnog mlijeka može se zaključiti da je ovaj parametar stabilan, te su rezultati usporedivi s rezultatima drugih istraživanja i sukladni s vrijednostima navedenim na deklaraciji proizvoda.

8. Literatura

1. Ajerdini S. (2012.). Razvoj i validacija metode za određivanje ugljikohidrata u uzorcima hrane za dojenčad u svrhu praćenja sigurnosti. Diplomski rad. Zagreb.
2. Antunac, N., Havranek-Lukač, J., Samaržija, D. (1997.). Somatske stanice i njihov utjecaj na kakvoću i preradu mlijeka. Mljekarstvo 47: 183-193.
3. Araujo P. (2009.) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. J Chromatogr B. 877: 2224-2234.
4. Bylund, G. (2003.). Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB.
5. 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.
6. Dionex. (20fanal11.). Measuring Lactose in Milk: A Validated Method. Application update 182.
7. Euber, J. R., Brunner, J. R. (1979.). Determination of lactose in milk products by high-performance liquid chromatography. Department of food science and human nutrition. Michigan State University. Journal of Dairy Science Vol. 62:685-690.
8. Feldhofer S., Matić G., Starčević H. (1999.). Istraživanja glavnih sastojaka sirovog mlijeka krava na obiteljskim gospodarstvima. Mljekarstvo 49 (2): 95-104.
9. Feldhofer S., Vašarević G., Klišanić A. (1998.). Utjecaj hranidbe krava s dodatkom soj ine sačme i ljuske na bezmasnu suhu tvar i bjelančevine mlijeka. Mljekarstvo 48(4): 227-236.
10. 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. Carbohyd. Polym. 37, 225-229.
11. Fusch, G., Choi A., Rochow N. i Fusch C. (2011.). Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 879 (31):3759–62.
12. Gonzalez A. G., Herrador M. A. (2007.). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. (2007.). Trends in Analytical Chemistry. 26: 227-238., 2007.
13. Havranek J. L., Antunac N. (1996.). Prehrambena svojstva mlijeka. Mljekarstvo 46(1): 3-14.
14. HRN ISO 22662:2010 (2010.). Mlijeko i mliječni proizvodi.- Određivanje udjela laktoze pomoću tekućinske kromatografije visokog učinka (Referentna metoda)
15. Hrvatsko mjeriteljsko društvo. (2006.). Validacija analitičkih metoda. Seminar. Zagreb.
16. Huber L. (2011.). Validation of Analytical Methods. Agilent Technologies. 18−19.
17. Inacio M. R. C., de Moura M. D. V. , de Lima K.M.G. (2011.). Classification and determination of total protein in milk powder using near infrared reflectance spectrometry and the successive projections algorithm for variable selection. Vibrational Spectroscopy. 57(2): 342–5.

18. Iniguez, J. R., Gomez, R. (1988.). Fitness of pasteurized milk of general quality standard. Alimentario, 25 (1986), 33—35. Prema Dairy Science Abstracts 51 (1989) (6), 2422.
19. IUPAC (1993.). Nomenclature for Chromatography. Pure and appl. Chem. 65(4): 819-872.
20. IUPAC Technical Report. (2002.). Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure Appl. Chem. 74: 835.
21. Jasti L. S., Dola S. R., Fadnavis N. W., Addepally U., Daniels S., Ponrathnam S. (2014.). Co-immobilized glucose oxidase and b-galactosidase on bovine serum albumin coated allyl glycidyl ether (AGE)- ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) copolymer as a biosensor for lactose determination in milk. Enzyme and Microbial Technology. 64–65: 67–73.
22. Kailasapathy K. (2008.). Chemical composition, physical, and functional roperties of milk and milk ingredients. In Dairy processing and quality assurance, ed. R. C. Chandan, A. Kilara, and N. P. Shah. Hoboken New Jersey: Blackwell Publishing. 75–103.
23. Kaštelan-Macan M. (2003.). Kemijska analiza u sustavu okoliša. Školska knjiga. Zagreb.
24. Kosir M. (2016.). Određivanje glifosfata ionskom kromatografijom. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
25. Mikulec N., Samaržija D., Antunac N., Zamberlin Š., Kuliš Z., Horvat I. (2004.). Parametri validacije instrumentalne metode za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku. Mljekarstvo. Zagreb. 54 84: 299-314.
26. Neumann, C., D. M. Harris, L. M. Rogers. (2002.). Contribution of animal source foods in improving diet quality and function in children in the developing world. Nutrition Research 22 (1–2):193–220.
27. O'Mahony J. A., Fox P. F. (2014.). Chapter 2 - milk: An overview. In Milk proteins, ed. H. Singh, M. Boland, and A. Thompson, 2nd ed., San Diego: Academic Press. 145–239.
28. Petričić A. (1984.). Konzumno i fermentirano mlijeko. Udruženje mljekarskih radnika Hrvatske. Zagreb.

Popis korištenih izvora-poveznica:

29. Renner E. (1983.). Milk and Dairy products in Human Nutrition. Justus-Llebig-University Giessen. Germany.
30. Sabadoš D. (1996.). Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda. Hrvatsko mljekarsko društvo. Zagreb.
31. Schuster-Wolff-Buhring, R., R. Michel, and J. Hinrichs. (2011.). A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. Dairy Science and Technology 91 (1):27–37.
32. Silveira M. F., Masson L. M. P., Martins J. F. P., Alvares T. D., Paschoalin V. M. F., de la Torre C.L., Conte C. A. (2015.). Simultaneous determination of lactulose and lactose in conserved milk by HPLC-RID. Journal of Chemistry Article. ID 185967.
33. Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. (2004.). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Trenda in Analytical Chemistry. Vol 23: 535-551.
34. Terol A., Paredes E., Maestre S. E., Prats S., Todoli J. L. (2012.). Rapid and sensitive determination of carbohydrates in foods using high temperature liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Journal of Separation Science 35 (8):929–36.

35. Tratnik Lj. (1998.). Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
36. Wilt T. J., Shaukat A., Shamliyan T., Taylor B. V., MacDonald R., Tacklind J., Rutks I., Schwarzenberg S. J., Kane R. L., Levitt M. (2010.). Lactose intolerance and health. Rockville. AHRQ Publication.
37. Xin Q., Ling H. Z., Long T. J., Zhu Y. (2006.). The rapid determination of fat and protein content in fresh raw milk using the laser light scattering technology. Optics and Lasers in Engineering 44 (8):858–69.
38. Xinmin W., Ruili Z., Zhihua L., Yuanhong W., Tingfu J. (2008.). Determination of glucosamine and lactose in milk-based formulae by high-preformance liquid chromatography. J. Food Comp. Analysis. 21: 255-258.
39. 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.
40. Zhu X., Guo W., Jia Y., Kang F. (2015.). Dielectric properties of raw milk as functions of protein content and temperature. Food and Bioprocess Technology. 8 (3): 670–80.
41. Zhu Z., Guo W. (2020.). Recent developments on rapid detection of main constituents in milk: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

1. https://www.scribd.com/document/382714871/05-Dario-Mandic-Uvod-u-Kromatografske-Separacije

9. Životopis

Ivana Šarčević rođena je 24.09.1996. godine u Zagrebu. Nakon završene Osnovne škole Ivana Mažuranića u Zagrebu upisuje IX. Gimnaziju u Zagrebu gdje završava školovanje u općoj gimnaziji.
2015. godine nastavlja obrazovanje na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje upisuje preddiplomski studij Agroekologija. Nakon završenog preddiplomskog studija, 2018. godine upisuje diplomski studij Agroekologija, također na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.
Uz fakultetsko obrazovanje radila je na raznim studenskim poslovima u prodaji, ugostiteljstvu i animaciji.