

Potencijal blisko-infracrvene spektroskopije u praćenju kvalitete dojenačkih formula za posebne potrebe

Majić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:762369>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Iva Majić

POTENCIJAL BLISKO-
INFRACRVE NE SPEKTROSKOPIJE
U PRAĆENJU KVALITETE
DOJENAČKIH FORMULA ZA
POSEBNE POTREBE

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić.

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić, na pomoći, strpljenju, razumijevanju i podršci prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj mami, što mi je kroz cijelo odrastanje bila uzor, oslonac i vjetar u leđa.

Posebno hvala mom Marku na bezuvjetnoj ljubavi, razumijevanju i podršci svih ovih godina.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

POTENCIJAL BLISKO-INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U PRAĆENJU KVALITETE DOJENAČKIH FORMULA ZA POSEBNE POTREBE

Iva Majić, univ. bacc. nutr. 0058210205

Sažetak: Zbog zaštite zdravlja i dobrobiti dojenčadi, izuzetno je važan sastav te nutritivna kvaliteta dojenačkih formula, ali i ispravno doziranje. Stoga je cilj ovog rada bio analizirati i usporediti energetske sastav i zastupljenost makronutrijenata u pet različitih dojenačkih formula te ispitati potencijal primjene blisko-infracrvene spektroskopije u praćenju spomenutog. Korištena laboratorijski i prijenosni NIR uređaji, koji snimaju uzorke na molekularnoj razini, u vibracijskom spektru 900 – 1699 nm. Dojenačkim formulama mjereni su i parametri boje te vodljivost i ukupne otopljene tvari. Primijenjeni su kemometrijski alati kako bi se istražile sličnosti i/ili razlike među uzorcima. Analizirane dojenačke formule namijenjene su dojenčadi s osjetljivim probavnim sustavom ili potvrđenom alergijom na proteine kravljeg mlijeka. Za svaku dojenačku formulu pripremljen je broj uzoraka koji odgovara različitoj dobi, prema uputi na deklaraciji proizvoda. Dobiveni NIR spektri kombinirani su s kemometrijskim metodama, konkretno analizom glavnih komponenata i regresijom glavnih komponenata te su pokazali visoku primjenjivost, kvalitativno i kvantitativno.

Ključne riječi: *dojenačke formule, NIR spektroskopija, kemometrija*

Rad sadrži: 66 stranica, 33 slike, 11 tablica, 51 literaturni navod, 8 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Maja Benković (član)
4. izv. prof. dr. sc. Irena Keser (zamjenski član)

Datum obrane: 19. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Graduate university study program: Nutrition

THE POTENTIAL OF NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY IN QUALITY MONITORING
OF INFANT FORMULAS FOR SPECIAL NEEDS

Iva Majić, univ. bacc. nutr. 0058210205

Abstract: To protect infants' health and wellbeing, not only infant formulas' composition is important, but also their dosing. Therefore, the aim of this work was to analyse and compare the energy content along with macronutrient composition in five infant formulas and check the potential near-infrared spectroscopy in sample analysing. Two different NIR spectrometers were being used (laboratory and portable), which analyse samples on molecular level, in vibrational spectrum from 900 to 1699 nm. Analysis of five different infant formulas was conducted, whether for sensitive baby's digestive system or hypoallergenic. Several samples were made for every infant formula, according to instructions on packaging. In addition, colour parameters were measured. Conductivity and total dissolved solids were determined, for the purpose of detecting similarities and/or differences between samples. The recorded NIR spectra was combined with chemometric methods, precisely with principal component analysis and principal component regression and has shown high applicability.

Keywords: *infant formulas, NIR spectroscopy, chemometrics*

Thesis contains: 66 pages, 33 figures, 11 tables, 51 references, 8 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasenka Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor

Reviewers:

1. Ana, Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (president)
2. Jasenka, Gajdoš Kljusurić, PhD, Full professor (mentor)
3. Maja, Benković, PhD, Associate professor (member)
4. Irena, Keser, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 19th, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. DOJENAČKE FORMULE	3
2.1.1. Energetske potrebe dojenčadi	4
2.1.2. Dojenačke formule i pretilost.....	5
2.1.3. Dojenačke formule i crijevna mikroflora	6
2.2. ALERGIJA NA MLIJEKO	7
2.2.1. Manifestiranje alergije na proteine kravljeg mlijeka	11
2.2.2. Problematika dojenačkih formula na bazi kozjeg mlijeka	12
2.3. DOJENČAD S OSJETLJIVIM GASTROINTESTINALNIM TRAKTOM	13
2.4. PRAĆENJE KVALITETE.....	13
2.3.1. Zakonska regulativa	13
2.4. METODE PRAĆENJA KVALITETE HRANE	14
2.4.1. Kolorimetrija	15
2.4.2. Spektroskopija.....	15
2.4.3. Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Priprema uzoraka	17
3.2. METODE.....	22
3.2.1. Mjerenje vodljivosti i ukupne otopljene krute tvari.....	22
3.2.2. Blisko-infracrvena spektroskopija	22
3.2.3. Mjerenje boje	24
3.2.4. Obrada podataka.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. MASE MJERICA	27
4.1.1. Usporedba masa otprilike uzetih i vrhom punih mjerica	27
4.1.2. Usporedba masa vrhom punih mjerica i deklariranih masa mjerica	29
4.2. MAKRONUTRITIVNI I ENERGETSKI SASTAV DOJENAČKIH FORMULA	30
4.2.1. Sastav makronutrijenata	30
4.2.2. Energetska vrijednost	32
4.3. BOJE UZORAKA DOJENAČKIH FORMULA.....	35
4.3.1. Kolorimetrijska analiza	35

4.3.2. Promjena boje dojenačkih formula u odnosu na mlijeko u prahu.....	41
4.4. VODLJIVOST UZORAKA DOJENAČKIH FORMULA	43
4.5. ANALIZA REZULTATA NIR SPEKTROSKOPIJE	45
4.5.1. NIR spektri dojenačkih formula snimljeni laboratorijskim uređajem.....	45
4.5.2. NIR spektri dojenačkih formula snimljeni prijenosnim uređajem.....	49
4.6. KEMOMETRIJA	53
4.6.1. Analiza glavnih komponenata.....	54
4.6.2. Regresija glavnih komponenata	58
5. ZAKLJUČCI	61
6. LITERATURA	62
7. PRILOZI.....	

1. UVOD

Dojenje se smatra idealom prehrane dojenčadi, međutim, zbog različitih razloga ono nije uvijek moguće. Upravo su zato osmišljene dojenačke formule, čijim se razvojem kroz godine nastoji što je više moguće približiti sastavu majčinog mlijeka.

Usavršavanjem dojenačkih formula različiti su proizvođači kroz godine došli do različitih formulacija i namjena pa se tako danas na tržištu nalaze i hipoalergene dojenačke formule te dojenačke formule namijenjene dojenčadi s osjetljivim probavnim sustavom. Uloga ovih formula je lakša probavljivost te smanjenje rizika od razvoja alergije na proteine kravljeg mlijeka ili, u slučaju već postojeće alergije, služe kao glavni izvor prehrane za dojenčad s uspostavljenom dijagnozom alergije.

Alergija na proteine kravljeg mlijeka najčešća je alergija na hranu u djece, a dijagnoza se uglavnom uspostavlja u djece mlađe od godinu dana. Hipoalergenske dojenačke formule na tržištu se pojavljuju u obliku ekstenzivnih hidrolizata ili kao aminokiselinske formule (na bazi aminokiselina). Dojenačke formule namijenjene dojenčadi s osjetljivim probavnim sustavom uključuju dojenačke formule s dodatkom probiotika te dojenačke formule na bazi kozjeg mlijeka.

Novija istraživanja sve se više bave usporedbom majčinog mlijeka i dojenačkih formula te praćenjem razvoja dojenčadi hranjene majčinim mlijekom, u usporedbi s dojenčadi hranjenom dojenačkim formulama, uključujući sastav crijevne mikroflore te sklonost respiratornim bolestima, alergijama ili probavnim smetnjama. Majčino mlijeko karakterizira dinamičan sadržaj svih komponenti, koji se prilagođava jedinstvenim potrebama dojenčeta. Suprotno tome, sastav dojenačkih formula stalan je i nepromjenjiv pa ne prati nužno sve nutritivne potrebe dojenčeta, koje se mijenjaju ovisno o raznim stanjima, npr. u prisustvu bolesti. Iako je napredak u razvoju dojenačkih formula primjetan, majčino mlijeko još uvijek ostaje nedostižan cilj i zlatni standard prehrane dojenčadi, ali i boljitka majčinog zdravlja.

Sastav dojenačkih formula izuzetno je važan zbog izravnog utjecaja na rast i razvoj dojenčadi, stoga je važno da se različite dojenačke formule ne razlikuju značajno u zastupljenosti makronutrijenata i energetske unosu, kako bi sva dojenčad hranjena dojenačkim formulama imala zagarantiran adekvatan energetske i makronutritivni unos. Bitna zadaća proizvođača dojenačkih formula je i osigurati da roditelji svom djetetu mogu pripremiti bočicu adekvatnog

energetskog sastava, a to mogu osigurati prilaganjem precizne mjerice kojom se iz pakiranja dojenačke formule izuzima točno određena masa praha.

Svaka nepravilnost u energetskom ili makronutritivnom sastavu dojenačkih formula može imati negativne posljedice na rast i razvoj dojenčeta ili stvoriti predispoziciju za razvoj pretilosti kasnije u djetinjstvu.

Stoga je cilj ovog rada bio analizirati i usporediti energetski sastav i zastupljenost makronutrijenata u pet različitih dojenačkih formula, namijenjenim djeci s alergijom na proteine kravljeg mlijeka ili djeci s osjetljivim probavnim sustavom te ispitati potencijal primjene blisko-infracrvene spektroskopije u praćenju spomenutog. Mjereni parametri koji omogućuju analizu uključuju: masu mjerica priloženih u pakiranju dojenačkih formula, energetski sastav i udio makronutrijenata, parametre boje, vodljivost i količinu ukupnih otopljenih tvari, NIR apsorpcijske spektre te kemometrijsku obradu prikupljenih podataka.

Za potrebe istraživanja korištena su dva različita uređaja za mjerenje bliske infracrvene spektroskopije, a to su laboratorijski NIR, čiji se raspon valnih duljina kretao između 904 i 1699 nm, te prijenosni NIR, s rasponom valnih duljina od 900 do 1700 nm. Rezultati prikupljeni NIR spektroskopijom, sa ciljem pouzdanije analize podataka, obrađeni su kemometrijskim metodama, i to metodom analize glavnih komponenata (PCA) te regresijom glavnih komponenata (PCR).

2. TEORIJSKI DIO

Dojenje je prirodna baza prehrane dojenčadi te predstavlja optimalnu osnovu za rast i razvoj djeteta. Majčino je mlijeko tekućina dinamičnog, promjenjivog sastava, koji se mijenja u skladu s trenutnim potrebama dojenčeta za određenim makro- i mikronutrijentima. Na taj način osigurava energiju i nutrijente potrebne za sve razvojne i fiziološke procese djeteta. Majčino se mlijeko smatra jedinstvenim po sastavu, a na njega utječu razni čimbenici, poput prehrane i zdravlja te sastava tijela majke (Salminen i sur., 2020). U savršenim uvjetima, dojenje bi bilo isključiva prehrana dojenčeta sve do razdoblja uvođenja dohrane, jer osigurava sve potrebne makronutrijente, vitamine, minerale i imunomodulatorne faktore u omjerima koji zadovoljavaju potrebe djetetovog organizma te se, ovisno o promjenama potreba, i sam sastav majčinog mlijeka prilagođava (Leung i Sauve, 2005). Međutim, isključivo dojenje nije uvijek moguće ostvariti, za što postoje različiti mogući uzroci. Jedan od razloga može biti pojava poteškoća koje otežavaju ili onemogućavaju dojenje (npr. mastitis). Također, uslijed raznih čimbenika moguć je nedostatak mlijeka, a moguće je i da dijete odbija dojenje pa ne preostaje drugo osim prehrana dojenačkim formulama. Nadalje, pojava alergija na proteine kravljeg mlijeka također može biti uzrok prestanka dojenja i početka korištenja dojenačkih formula.

2.1. DOJENAČKE FORMULE

Prehrana već od najranije dobi može imati dugotrajan utjecaj na metaboličke čimbenike u odrasloj dobi. Iako se dojenje smatra *zlatnim standardom*, većina dojenčadi barem se djelomično hrani dojenačkim formulama (Lemaire i sur., 2018). Dojenačke su formule osmišljene na način da oponašaju sastav majčinog mlijeka te su namijenjene dojenčadi koja ne konzumiraju majčino mlijeko. Prema Rumbak (2018), majčino mlijeko sadrži 6 % proteina, 55 % masti i 39 % ugljikohidrata, dok se u dojenačkim formulama nalazi 9 % proteina, 49 % masti i 42 % ugljikohidrata. Cilj dojenačkih formula je ostvariti funkcionalne komponente i učinke slične majčinom mlijeku, kako bi se osigurao optimalan rast i razvoj djeteta, razvoj imunološkog sustava te metabolizma djeteta. Unatoč naporima koji se već desetljećima ulažu u razvoj dojenačkih formula s namjerom da njihov sastav, ali i uloga i konačan rezultat vidljiv u razvoju djeteta budu što sličniji funkciji majčinog mlijeka, obrasci rasta i sastav tijela i dalje se razlikuju kod djece hranjene dojenačkim formulama, u usporedbi s djecom hranjenom majčinim mlijekom, što može doprinijeti povećanom riziku za razvoj pretilosti kod djece hranjene dojenačkim formulama

(Kouwenhoven i sur., 2022). Dojenačke formule su tijekom godina uznapredovale, odnosno, njihov sastav se kroz godine razvoja poboljšao, no, unatoč očitim promjenama, potrebno ih je dodatno unaprijediti, kako bi se razlika između formula i majčinog mlijeka svela na minimum. Mnogobrojna su pitanja o razvoju dojenačkih formula i dalje neodgovorena, a jedno od njih je kako promjena u sastavu dojenačkih formula može utjecati na metabolizam dojenčeta te kakvi mogu biti dugoročni učinci. Razmatra se i smanjenje sastava proteina u dojenačkim formulama, prilagodba sastava lipida, a dodatak prebiotika, probiotika, ili, u najboljoj varijanti, sinbiotika postaje vrlo poželjan (Lemaire i sur., 2018).

2.1.1. Energetske potrebe dojenčadi

Rast djeteta ključan je pokazatelj stupnja zadovoljavanja djetetovih energetske potrebe. Adekvatan rast i razvoj djeteta postiže se primjerenim unosom energije i balansiranim unosom nutrijenata (Butte, 1989). Iako je poznato da se zdravo dojenče hrani na zahtjev i da ne postoji precizno definirano vrijeme između podoja (hranjenja), ipak postoje procijenjene dnevne energetske potrebe za djecu do prve godine života, koje se razlikuju ovisno o tome je li dijete hranjeno dojenačkom formulom ili doji. Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization, FAO*) u svom izvješću iz 2004. godine donosi tablično prikazane energetske potrebe za djecu od 0 do 12 mjeseci života, izračunate na temelju izračuna ukupne potrošnje energije (engl. *total energy expenditure = TEE*). Iz izvješća je vidljivo da su energetske potrebe dojenčadi hranjene majčinim mlijekom manje nego dojenčadi hranjene dojenačkim formulama

Tablica 1. Energetske potrebe dojenčadi izražene u kcal/kg TM/dan (FAO, 2004)

Dob (mjeseci)	Prehrana majčinim mlijekom			Prehrana dojenačkom formulom		
	Dječaci	Djevojčice	Prosjeak	Dječaci	Djevojčice	Prosjeak
	kcal /kg TM/ dan					
1	106	99	102	122	117	120
2	98	95	97	110	108	109
3	91	90	90	100	101	100
4	79	80	79	86	89	87
5	79	79	79	85	87	86
6	78	79	78	83	85	84

Tablica 1. Energetske potrebe dojenčadi izražene u kcal/kg TM/dan – *nastavak*

Dob (mjeseci)	Prehrana majčinim mlijekom			Prehrana dojenačkom formulom		
	Dječaci	Djevojčice	Prosjek	Dječaci	Djevojčice	Prosjek
	kcal /kg TM/ dan					
7	76	76	76	81	81	81
8	77	76	76	81	81	81
9	77	76	77	81	81	81
10	79	77	78	82	81	81
11	79	77	78	82	81	81
12	79	77	78	82	81	81

2.1.2. Dojenačke formule i pretilost

Kvaliteta prehrane u najranijoj dobi, ali i njezina kvantiteta, već u prvim mjesecima života imaju ključnu ulogu, zbog svog utjecaja na razvoj metabolizma djeteta i na promjene tjelesne mase. Majčino mlijeko smatra se idealnom prehranom za novorođenče pa i Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization, WHO*) preporuča upravo dojenje kao jedinu prehranu djeteta sve do šestog mjeseca života, a nakon toga dojenje uz dohranu sve do druge godine ili i duže (Salminen i sur., 2020). Usprkos preporukama, 2013. u Sjedinjenim Američkim Državama 81,1 % novorođenčadi hranilo se majčinim mlijekom nakon rođenja, međutim, sa šest mjeseci tek je 22,3 % dojenčadi konzumiralo majčino mlijeko. Sličan trend pokazala su i istraživanja u europskim zemljama. Upravo su prvi mjeseci života kritičan period u prevenciji metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja te pretilosti kasnije u životu. Pretilost u djece i adolescenata povezana je s krvnim tlakom i razinama glukoze u krvi te rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Smatra se kako je porast tjelesne mase u prvih šest mjeseci starosti djeteta bolji prediktor sastava tijela nego porast tjelesne mase u dobi od 6 mjeseci do 2 godine (Lemaire i sur., 2018). Dokazano je da je rizik od pretilosti manji u djece hranjene majčinim mlijekom, a razlog tome moguće je potražiti u nekoliko mehanizama: specifična regulacija apetita, cirkulacija leptina u organizmu djeteta te sastav crijevne mikroflore. Također, potencijalno ključan mehanizam za smanjeni rizik od pretilosti kod dojene djece je i unos proteina, specifičan po tome što koncentracija proteina u majčinom mlijeku opada s vremenom, dok je koncentracija proteina u dojenačkim

formulama konstantna. Istraživanja su pokazala da je unos proteina tijekom prvih šest mjeseci života kod djece hranjene dojenačkim formulama čak 66 – 70 % viši nego što je to u djece hranjene majčinim mlijekom. Pretpostavlja se da je niži sadržaj proteina u majčinom mlijeku čimbenik koji povoljno utječe na rast djeteta te da bi niži unos proteina mogao biti ključan za prevenciju pretilosti u djece pa bi upravo snižavanje sadržaja proteina u dojenačkim formulama moglo biti ključ do smanjenja rizika od pretilosti u djece koja se njima hrane (Kouwenhoven i sur., 2022).

2.1.3. Dojenačke formule i crijevna mikroflora

Poznato je da crijevna mikroflora ima važnu ulogu u ljudskom zdravlju i metabolizmu, a njezin se sastav temeljito mijenja tijekom prve 2 – 3 godine života. Prema Salminen i sur. (2020), zdrava crijevna mikroflora zaslužna je za zdravu probavu i apsorpciju nutrijenata. Smatra se da je crijevna mikroflora zdravog, vaginalnim putem, u terminu rođenog djeteta hranjenog majčinim mlijekom *zlatni standard* zdravog gastrointestinalnog trakta u najranijoj dobi. Iako se dugo smatralo da je posteljica sterilno okruženje za dijete te da se prvi kontakt djeteta s bakterijama događa tijekom vaginalnog poroda (za razliku od djece rođene carskim rezom koja taj kontakt nemaju), prema posljednjim studijama, prvi kontakt ostvaruje se već tijekom trudnoće, što potvrđuje činjenica da su u krvi iz pupkovine, amnionskoj tekućini i placenti pronađene bakterije ili bakterijske nukleinske kiseline. Za daljnji razvoj crijevnog mikrobioma ključna je prehrana, jer ima direktan utjecaj na njezin sastav i funkciju. Majčino mlijeko sadrži više od 200 oligosaharida koji fermentiraju u crijevima i potiču rast bakterija. To se može nazvati „prebiotičkim učinkom“ majčinog mlijeka. Osim toga, ono je ujedno i izvor živih bakterija i to stafilokoka, streptokoka, bifidobakterija, bakterija mliječne kiseline, korisnih virusa pa čak i gljivica (mikrobiom majčinog mlijeka). Istraživanja pokazuju da novorođenčad hranjena dojenačkim formulama ima različit sastav crijevnog mikrobioma od djece hranjene majčinim mlijekom, s obzirom na količinu i raznolikost mikroba. Štoviše, dokazano je da dojenčad hranjena formulom pokazuje drugačiji imunološki odgovor u slučaju infekcije (dijareja i respiratorne infekcije). Mikrobiota dojenčadi hranjene dojenačkim formulama više je nalik onoj kod odraslih osoba. Navedene razlike potaknule su znanstvenike na razvoj novije generacije dojenačkih formula, koje sadrže prebiotike i probiotike, kako bi bile što sličnije majčinom mlijeku (Indrio i sur., 2022). Majčino mlijeko sadrži mnogobrojne komponente: stanice imunološkog sustava, promjenjive koncentracije bakterija i njihovih metabolita te oligosaharide. Koncentracija oligosaharida u majčinom mlijeku se procjenjuje na 12 – 15 g/L. Salminen i sur. (2020) navode kako su 2'-fukozillaktoza i lakto-N-neotetraoza dva oligosaharida prisutna u majčinom mlijeku,

koja je preporučljivo dodati u dojenačke formule. Majčino mlijeko sadrži i dobre bakterije (probiotike), kao što su *Bifidobacterium* sp. i *Lactobacillus* sp., od kojih je, kod djece rođene prirodnim (vaginalnim) putem, dominantniji *Bifidobacterium* sp. Osim navedenih probiotičkih bakterija, prisutni su i njihovi metaboliti, npr. butirati i druge kratkolančane masne kiseline, oligosaharidi i peptidi. Upravo su bakterijski metaboliti majčinog mlijeka su čest fokus novijih istraživanja, jer imaju moguću ulogu u rastu i razvoju novorođenčadi. O njima se govori kao o postbioticima, jer sadrže inaktivirane bakterijske stanice i metabolite i smatra se da doprinose održavanju zdrave crijevne mikroflore, kao i razvoju te funkciji imunosnog sustava. Većina dojenačkih formula koje sadrže bakterijske kulture, sadrže upravo *Bifidobacterium* sp. i bakterije mliječne kiseline, kao što su *Lactobacillus* sp. One se smatraju sigurnim za uporabu unutar Europske Unije te imaju status priznate pretpostavke o sigurnosti (engl. *Qualified Presumption of Safety*, QPS) (Salminen i sur., 2020). Za majčino mlijeko karakterističan je dinamičan (promjenjiv) sadržaj svih komponenti, koji se jedinstveno prilagođava potrebama dojenčeta. S druge strane, sastav dojenačkih formula nepromjenjiv je i neprilagodljiv pa djetetu ne pruža lepezu komponenti potrebnih za optimalno funkcioniranje i razvoj organizma. Iako je vidljiv napredak u razvoju dojenačkih formula kroz dodatak bakterijskih kultura u svrhu optimiziranja razvoja i funkcije crijevne mikroflore dojenčeta, majčino mlijeko ipak ostaje nenadmašan cilj i optimum za prehranu dojenčadi i njihov razvoj, kao i za boljitak majčinog zdravlja.

2.2. ALERGIJA NA MLJEKO

Alergija na proteine kravljeg mlijeka najčešća je alergija na hranu u djece, s prevalencijom između 1,9 % i 4,9 %. Djeca, kojoj se uspostavlja dijagnoza alergije na proteine kravljeg mlijeka, uglavnom su mlađa od jedne godine. S obzirom na to da je mlijeko u prvih šest mjeseci života jedini, a do prve godine glavni izvor energije i nutrijenata za dijete, kod alergije je, u slučaju nemogućnosti dojenja, vrlo bitno djetetu ponuditi odgovarajuću dojenačku formulu. Dojenčad s alergijom na proteine mlijeka ne može konzumirati ovčje ili kozje mlijeko, zbog jakih križnih alergijskih reakcija između proteina mlijeka sisavaca (Dupont i sur., 2020). Hipoalergenske dojenačke formule na tržištu se pojavljuju u obliku ekstenzivnih hidrolizata ili kao aminokiselinske formule (na bazi aminokiselina). Važno je istaknuti da i sam pojam hipoalergenske formule nema jedinstveno značenje svugdje u svijetu. Tako je npr. u Sjedinjenim Američkim Državama, prema Američkoj pedijatrijskoj akademiji (engl. *American Academy of Pediatrics*) hipoalergenska formula definirana kao formula koja se pokazala podnošljivom kod najmanje 90 % djece s

dijagnosticiranom alergijom na proteine kravljeg mlijeka, i to s intervalom pouzdanosti od 95 %. U Europi se, s druge strane, pojam hipoalergenske formule odnosi na svaku formulu koja sadrži hidrolizirane proteine pa prema tome ima i smanjenu alergenost. Prema delegiranoj uredbi Europske komisije 2016/127 određen je sastav makronutrijenata za hidrolizirane formule, bilo da se radi o formulama životinjskog (sadrže kazein i proteine sirutke) ili biljnog porijekla (proteini soje), koje se primjenjuju kod dojenčadi u prvoj godini života (D'Auria i sur., 2021).

Tablica 2. Energija i makronutritivni sastav hipoalergenskih dojenačkih formula (*prema D'Auria i sur., 2021*)

	Dojenačka formula (do 6 mjeseci)		Prijelazna formula (nakon 6 mjeseci)	
	Najmanja	Najveća	Najmanja	Najveća
Energija (kcal / 100 mL)	60	70	60	70
Energija (kJ / 100 mL)	250	293	250	293
PROTEINI				
Hidrolizirane formule (g/100 kcal)	1,86	2,8	1,86	2,8
Sojine formule (g/100 kcal)	2,25	2,8	2,25	2,8
Taurin (mg/100 kcal)		12		12
L-karnitin (mg/100 kcal)	1,2	-	-	-
MASTI (g/100 kcal)	4,4	6,0	4,4	6,0
Linolenska kiselina (mg/100 kcal)	500	1200	500	1200
Alfa-linolenska kiselina (mg/100 kcal)	50	100	50	100
DHA (mg/100 kcal)	20	50	20	50
TRANS masti	-	3 % od ukupnog sadržaja masti	-	3 % od ukupnog sadržaja masti

Tablica 2. Energija i makronutritivni sastav hipoalergenskih dojenačkih formula - *nastavak*

	Dojenačka formula (do 6 mjeseci)		Prijelazna formula (nakon 6 mjeseci)	
	Najmanja	Najveća	Najmanja	Najveća
Eruka kiselina	-	1 % od ukupnog sadržaja masti	-	3 % od ukupnog sadržaja masti
Kolin (mg/100 kcal)	25	50	-	-
Inozitol (mg/100 kcal)	4	40	-	-
Fosfolipidi (g/L)		2		2
UGLJIKOHIDRATI (g/100 kcal)	9	14	9	14
Pretkuhani ili želatinizirani škrob	-	2 g/100 mL i 30 % od ukupnog sadržaja ugljikohidrata		-
Sukroza (samo za hidrolizirane formule)	-	20 % od ukupnog sadržaja ugljikohidrata	-	20 % od ukupnog sadržaja ugljikohidrata
Glukoza (g/100 kcal; samo za hidrolizirane formule)	-	2	-	2
Frukto-/galakto-oligosaharidi (g/100 mL)	-	0,8	-	0,8

Tablica 3. Sadržaj mineralnih tvari u hipoalergenskim dojenačkim formulama (*prema D'Auria i sur., 2021*)

MINERALNE TVARI (na 100 kcal)				
	Dojenačka formula (do 6 mjeseci)		Prijelazna formula (nakon 6 mjeseci)	
	Najmanja	Najveća	Najmanja	Najveća
Natrij (mg)	25	60	25	60
Kalij (mg)	80	160	80	160
Kloridi (mg)	60	160	60	160
Kalcij (mg)	50	140	50	140
Fosfor (mg)				
Hidrolizirane formule	25	90	25	90
Sojine formule	30	100	30	100
Magnezij (mg)	5	15	5	15
Željezo (mg)				
Hidrolizirane formule	0,3	1,3	0,6	2
Sojine formule	0,45	2	0,9	2,5
Cink (mg)				
Hidrolizirane formule	0,5	1	0,5	1
Sojine formule	0,75	1,25	0,75	1,25
Bakar (µg)	60	100	60	100
Jod (µg)	15	29	15	29
Selen (µg)	3	8,6	3	8,6
Mangan (µg)	1	100	1	100
Molibden (µg)	-	14	-	14
Floridi (µg)	-	100	-	100

Tablica 4. Vitaminski sastav hipoalergenskih formula (*prema D'Auria i sur., 2021*)

VITAMINI (na 100 kcal)				
	Dojenačka formula (do 6 mjeseci)		Prijelazna formula (nakon 6 mjeseci)	
	Najmanja	Najveća	Najmanja	Najveća
Vitamin A (µg-RE)	70	114	70	114
Vitamin D (µg)	2	3	2	3
Tiamin (µg)	40	300	40	300
Riboflavin (µg)	60	400	60	400
Niacin (mg)	0,4	1,5	0,4	1,5
Pantotenska kiselina (mg)	0,4	2	0,4	2
Vitamin B₆ (µg)	20	175	20	175
Biotin (µg)	1	7,5	1	7,5
Folat (µg-DFE)	15	47,6	15	47,6
Vitamin B₁₂ (µg)	0,1	0,5	0,1	0,5
Vitamin C (mg)	4	30	4	30
Vitamin K (µg)	1	25	1	25
Vitamin E (mg alfa-tokoferola)	0,6	5	0,6	5

2.2.1. Manifestiranje alergije na proteine kravljeg mlijeka

Proteini kravljeg mlijeka jedan su od najčešćih uzročnika alergija u dojenčadi. Važno je razlikovati intoleranciju od alergije. Intolerancija na mlijeko uzrokovana je nedostatkom enzima laktaze, zbog čega dolazi do nemogućnosti razgradnje mliječnog šećera, laktoze, te pritom ne uključuje imunosnu reakciju. Upravo je to glavna razlika između intolerancije i alergije, koja uključuje imunosnu reakciju. Imunosna reakcija može biti reakcija koja je posredovana imunoglobulinom E (IgE-posredovana), reakcija koja nije posredovana imunoglobulinom E (ne-IgE posredovana) ili kombinacija potonjih dviju reakcija. Nadalje, alergijske reakcije uzrokovane proteinima kravljeg mlijeka mogu se manifestirati na različite načine i uključivati različite organe (D'Auria i sur., 2021).

Alergija na hranu može biti akutna ili kronična, a manifestirati se može gastrointestinalnim i ekstraintestinalnim simptomima (Martinis, 2004). Rane alergijske reakcije manifestiraju se unutar nekoliko minuta do najviše dva sata od konzumacije namirnice, u ovom slučaju mlijeka, dok se kasne alergijske reakcije manifestiraju u periodu od 48 sati pa do čak tjedan dana nakon ingestije. Kasne alergijske reakcije su uglavnom ne-IgE posredovane. Klinička slika alergije na proteine kravljeg mlijeka poprilično se razlikuje. Simptomi ne-IgE posredovane reakcije najčešće uključuju probavni sustav te mogu dovesti do proktokolitisa izazvanog bjelančevinama, sindrom enterokolitisa izazvanog bjelančevinama te Heinerov sindrom. S druge strane, simptomi IgE-posredovane ili kombinirane alergijske reakcije uključuju alergijski eozinofilni ezofagitis, eozinofilni gastritis i atopijski dermatitis (Flom i Sicherer, 2019). Iako je alergija na proteine mlijeka najčešća alergija u dojenčadi, neki se znanstvenici bave problematikom njezine prevencije. Prema Urashima i sur. (2019), ukoliko se kod novorođenčadi, koja nije hranjena majčinim mlijekom, u prva tri dana života primjenjuje dojenačka formula koja ne sadrži proteine kravljeg mlijeka (konkretno dojenačka formula na bazi aminokiselina), može doći do prevencije senzibilizacije ne samo na proteine kravljeg mlijeka, nego i na ostale nutritivne alergene.

2.2.2. Problematika dojenačkih formula na bazi kozjeg mlijeka

Alergija na proteine kravljeg mlijeka čest je zdravstveni problem u dojenčadi te je stoga potrebno pronaći adekvatne zamjene, a to su najčešće dojenačke formule na bazi proteinskih hidrolizata. Međutim, u nekim zemljama je praksa da liječnici preporučuju formule na bazi kozjeg mlijeka (Bellioni-Businco i sur., 1999). Prema Dupont i sur. (2020), dojenčad s alergijom na proteine mlijeka ne može konzumirati kozje mlijeko zbog jakih križnih alergijskih reakcija između proteina mlijeka sisavaca. Ipak, proizvođači dojenačkih formula na bazi kozjeg mlijeka svoje formule predstavljaju kao namijenjene djeci s povećanim rizikom od razvoja alergije ili već postojećom dijagnozom alergije na proteine kravljeg mlijeka. Jung i sur. (2017) navode da je kozje mlijeko sastavom nalik majčinom mlijeku te da sadrži A2-beta-kazein, za razliku od kravljeg mlijeka, koje sadrži još i A1-beta-kazein. Upravo zbog prisutnosti A2-beta kazeina i izostanka A1 varijante ovog proteina, kozje mlijeko korisno je za dojenčad alergičnu na proteine kravljeg mlijeka (Jung i sur., 2017). Nadalje, smatra se da A1 protein u dojenčadi s osjetljivim gastrointestinalnim traktom doprinosi nastanku probavnih smetnji, kao što su dijareja ili konstipacija (Pensabene i sur., 2018). Naime, razgradnjom A1 proteina nastaje peptid beta-kazomorfín (BCM-7), koji se veže na opioidne receptore u crijevima dojenčadi i uzrokuje smanjenu pokretljivost crijeva. Upravo duže

zadržavanje hrane u gastrointestinalnom traktu produžuje razdoblje fermentacije kratkolančanih ugljikohidrata, što je mogući uzrok nastanka plinova, nadimanja i osjećaja nelagode (Brooke-Taylor, 2017).

2.3. DOJENČAD S OSJETLJIVIM GASTROINTESTINALNIM TRAKTOM

Dojenačke kolike i konstipacija javljaju se u gotovo polovice dojenčadi te se ubrajaju u funkcionalne gastrointestinalne poremećaje (eng. *functional gastrointestinal disorders, FGIDs*), kao i regurgitacija te dijareja. Procjenjuje se da od rođenja do šest mjeseci starosti jedno od dvoje dojenčadi razvije barem jedan simptom povezan s funkcionalnim gastrointestinalnim poremećajima. Osim što su ovakvi simptomi bolni i nelagodni za dijete te su čest uzrok plača, uzrokuju i brigu kod roditelja pa postoji težnja za pronalaskom brzog i efikasnog rješenja. Velika je mogućnost da rješenje leži u promjeni korištene dojenačke formule (Vandenplas i sur., 2019). Povoljan utjecaj na gastrointestinalni trakt dojenčadi s osjetljivim probavnim sustavom pokazale su već spomenute dojenačke formule na bazi kravljeg mlijeka s dodatkom probiotika (Zhu i sur., 2021) i dojenačke formule na bazi kozjeg mlijeka (Jung i sur., 2017) .

2.4. PRAĆENJE KVALITETE

Praćenje kvalitete dojenačkih formula od iznimne je važnosti za očuvanje zdravlja dojenčeta. Kontrola količine prisutnih sastojaka, uključujući vitamine i minerale, ali i potencijalnih kontaminanata (npr. kemikalije, pesticidi, dušikovi spojevi, ...) ima presudnu ulogu, jer previsoke koncentracije pojedinih elemenata mogu dovesti do kobnog ishoda, s obzirom na to da su u dječjem organizmu toksični spojevi puno koncentriraniji, nego što je slučaj u organizmu odrasle osobe. Do kontaminacije dojenačkih formula obično dolazi tijekom proizvodnje. Poznato je da spomenuti kontaminanti mogu imati hepatotoksični, mutageni, karcinogeni ili imunotoksični učinak pa je upravo zbog zaštite zdravlja i dobrobiti konzumenata potrebno strogo kontrolirati sam sastav dojenačkih formula i proces njihove proizvodnje (de Mendonça Pereira i sur, 2020).

2.3.1. Zakonska regulativa

Da bi dojenačke formule uopće bile stavljene na tržište, svojim sastavom moraju zadovoljavati niz zakonskih odredbi i regulativa te određene nutritivne preporuke. Ovisno o dijelu svijeta, za upravljanje regulativama odgovorna su različita tijela. I dok je to u Sjedinjenim Američkim Državama primarno Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) na području Europske Unije za donošenje takvih propisa odgovoran je Europski parlament

(engl. *European Parliament*) zajedno s Europskim vijećem (engl. *European Council*). Oni se nalaze na najvišoj razini te imaju zadatak postavljanja glavnih uredbi. Nakon što Europska komisija odobri okvirnu direktivu, Europski odbor (engl. *European Committee*) je odgovoran za implementaciju direktive. Ovaj sustav kontrole hrane uključuje i Europsku agenciju za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority, EFSA*) zajedno sa Europskom komisijom (engl. *European Commission, EC*). EFSA nema ovlasti za kreiranje zakona i regulativa, ali je odgovorna za cijeli proizvodni lanac hrane i za dostavljanje procijenjenog rizika Europskoj komisiji, Europskom parlamentu i svim državama članicama Europske unije. Europska komisija ima ulogu u koordinaciji i provedbi odluka Europskog parlamenta te provedbi postojećih zakona u zemljama članicama Europske unije. Zbog sve jače potrebe za usuglašenjem standarda za prehranu djece i proizvodnju dječje hrane, 1974. nastao je Upravni odbor Europskog društva za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (ESPGHAN). U siječnju 2000. Europska Unija objavila je Bijelu knjigu o sigurnosti hrane. Ona sadrži 84 mjere za sigurnost hrane te postavlja zahtjeve za sastav hrane, deklariranje proizvoda te gornje granice ostataka pesticida u dojenačkim formulama i dječjoj hrani. Uredbe vezane za dojenačke formule pisane su u obliku pravila ili direktiva, koje članice Europske Unije mogu direktno primijeniti, a odnose se na dojenačke formule na bazi hidroliziranih proteina, formule na bazi žitarica te dojenačke formule za posebne prehrambene namjene. Navedeni su odobreni sastojci prikladni za proizvodnju i primjenu za specifične nutritivne potrebe. Također, navedeno je da je dodavanje novih sastojaka dojenačkim formulama ili već odobrenih sastojaka u količinama iznad propisanog standarda moguće, ukoliko takvu izmjenu odobre Znanstveni odbor za hranu (engl. *Scientific Committee on Food, SCF*), Odbor za medicinski aspekt hrane i politiku prehrane (engl. *UK Committee on the Medical Aspects of Food and Nutrition Policy, COMA*) i ESPGHAN (Upravni odbor Europskog društva za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu) (Jiang, 2014).

2.4. METODE PRAĆENJA KVALITETE HRANE

Održavanje kvalitete i sigurnosti hrane oduvijek je predstavljalo izazov. I dok su kroz protekla desetljeća glavnu prijetnju sigurnosti hrane predstavljali kemijski kontaminanti, proteklih godina sve su češće razne mikrobiološke kontaminacije (Fung i sur., 2018). Bilo u procesu proizvodnje ili tijekom skladištenja, hrana i prehrambeni proizvodi u stalnom su riziku od izloženosti raznim kontaminacijama pa je potrebno osigurati da do istih ne dođe. Kako bi se osiguralo da hrana na

tržište i do konzumenata dolazi mikrobiološki i zdravstveno ispravna, postoje razne metode praćenja kvalitete hrane, koje pomažu u detekciji kontaminanata i analizi sastava hrane.

2.4.1. Kolorimetrija

Kolorimetar je jednostavan uređaj za mjerenje apsorbancije nekog tekućeg uzorka pri određenim valnim duljinama, a sastoji se od izvora svjetlosti, držača kivete (uzorka), senzora intenziteta svjetlosti i sredstva za kontrolu izvora svjetlosti i integraciju intenziteta propuštene svjetlosti. Metode kolorimetrije široko su primjenjive u istraživanjima i prehrambenoj industriji, između ostalog i u kontroli skladištenja namirnica, npr. istraživanja na skladištenom kruhu, mlijeku ili čokoladi (Anzalone i sur., 2013).

2.4.2. Spektroskopija

Spektroskopija je grana analitičke kemije koja se bavi dobivanjem informacija o kemijskom sastavu i strukturi tvari, na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetske promjene u jezgrama atoma, elektronskom omotaču atoma ili u molekulama, kao posljedica njihove interakcije s elektromagnetskim zračenjem ili česticama (Raos i Kaštelan-Macan, 2015). Primjena spektroskopskih analiza u prehrambenoj industriji pruža mogućnost provođenja jeftine, ali i brze analize namirnica te ima ulogu u opisivanju teksture i strukture analizirane namirnice, a analizu je moguće obaviti u laboratoriju ili industrijskom pogonu (Matijević i Blažić, 2008).

2.4.3. Blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija

Blisko-infracrvena tzv. NIR spektroskopija (engl. *Near-infrared spectroscopy*) je nedestruktivna i brza metoda, koja je u proteklom desetljeću postala vrlo popularna za praćenje kvalitete hrane. NIR spektrometar se sastoji od izvora svjetlosti, razdjelnika snopa svjetlosti, reflektora, uzorka, detektora difuzne refleksije, detektora transmisije i kompjutera. NIR spektroskopija ima široku primjenu u prehrambenoj industriji upravo zbog svojih karakteristika – nudi brzu analizu, visoku reproducibilnost, nije skupa, ne troši uzorke, a rezultati se prikazuju i obrađuju na računalu. Može se upotrebljavati ne samo za brzu detekciju kontaminanata u hrani, nego i za procjenu kvalitete hrane u svrhu garancije sigurnosti hrane te za tehničku podršku u procesu proizvodnje hrane (Wang, 2019). Kao i svaka druga metoda, i NIR spektroskopija ima svoje nedostatke: standardna pogreška u laboratoriju dovodi do standardne pogreške u predviđanju te problema u izvedbi, a glavni nedostatak NIR spektroskopije u analizi hrane je njegova ovisnost o manje preciznim metodama, koje služe kao referentne (Pandiselvam i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju metoda NIR spektroskopije korištena je u svrhu analize nutritivnog sastava dojenačkih formula i detekcije eventualnih kontaminanata u formulama.

3.1. MATERIJALI

Analizirano je ukupno pet različitih dojenačkih formula četiriju proizvođača dostupnih na tržištu Republike Hrvatske. Od pet dojenačkih formula, njih dvije su hipoalergene (jedna od njih dostupna je isključivo u ljekarnama uz izdavanje na recept, po preporuci pedijatra), dvije dojenačke formule sadrže dodane probiotike (bakterije mliječne kiseline – *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716, prirodno izolirane iz majčinog mlijeka), koji obogaćuju crijevnu mikrofloru i olakšavaju probavu mlijeka. Jedna formula bazira se na kozjem mlijeku.

Dojenačke formule kupljene su u trgovini i/ili ljekarni te su čuvane na sobnoj temperaturi. Bile su pakirane u neprozirne vrećice u kartonskim kutijama ili u limenke. Unutar svake kutije ili limenke nalazila se i žličica, tj. mjerica namijenjena odmjeravanju potrebne količine praha za pripremu pojedinog obroka. Na svakom pakiranju dojenačke formule nalazile su se upute za pripremu mlijeka, odnosno točna masa praha (u gramima) i volumen vode koju je potrebno dodati (u mililitrima). Navedene upute bile su prikazane u skladu s potrebnim promjenama mase praha i volumena vode, sukladno dobi dojenčeta.

Analizirane dojenačke formule u nastavku rada označavat će se u skladu s pripadajućom oznakom (šifrom) navedenoj u Tablici 5.

Tablica 5. Označavanje dojenačkih formula

Dojenačka formula	Oznaka
Formula s probioticima 1	A
Formula s probioticima 2	B
Hipoalergenska formula 1	C
Hipoalergenska formula 2	D
Formula na bazi kozjeg mlijeka	E

3.1.1. Priprema uzoraka

Pribor potreban za pripremu uzoraka:

- Staklena čaša volumena 2 L
- Staklena čaša volumena 100 mL
- 6 dječjih bočica volumena 250 mL
- Stakleni lijevak

Aparatura korištena za analizu uzoraka:

- Analitička vaga
- Konduktometar (Omron uređaj, SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska)
- Kolorimetar (CM-700d (Konica Minolta Sensing INC, New York, USA)
- Stolni NIR spektrometar (Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , s instaliranim Control Development softverom Spec32)
- Prijenosni NIR spektrometar (mikro-NIR spektrometar (NIR-S-G1, InnoSpectra Corporation, Kina)
- Android tablet s aplikacijom za i pohranjivanje spektralnih podataka (ISC-NIRScan, InnoSpectra Corporation, Kina)

Ovisno o dobi dojenčeta i tome o kojoj se formuli radi, pripremano je 3 – 6 uzoraka za svaku od pet navedenih formula. Svaki uzorak sadržavao je različitu masu praha dojenačke formule i različit volumen vode, sukladno uputama proizvođača.

Broj pripremljenih uzoraka za pojedinu dojenačku formulu prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Broj uzoraka za pojedinu dojenačku formulu

Dojenačka formula	Broj uzoraka
A	6
B	6
C	3
D	4
E	4

Dakle, za dojenačku formulu 1 pripremljena su i analizirana 3 uzorka, za dojenačke formule 2 i 3 pripremljena su i analizirana po 4 uzorka, dok je za dojenačke formule A i B pripremljeno i analizirano po 6 uzoraka.

Postupak pripreme uzoraka započinje odvagom mase pojedine dojenačke formule na analitičkoj vagi. Kolika će se masa odvagati ovisi o broju mjerica potrebnom za pripremu bočice, koji je naveden na deklaraciji. Na primjer, za dojenačku formulu 1 prosječna masa mjerice navedena na deklaraciji proizvoda jest 7,3 grama te se za svaki uzorak formule 1 broj mjerica množio s prosječnom masom od 7,3 grama, kako bi se dobila ukupna prosječna masa praha dojenačke formule u uzorku. Na jednak se način računalo za svaku analiziranu formulu. Potom se u svaki uzorak dojenačke formule 1 dodala prokuhana vodovodna voda, u volumenu koji je naveden na pakiranju. Temperatura na koju je ohlađena prokuhana voda varira od proizvođača do proizvođača te je navedena na pakiranju. U slučaju pripreme dojenačke formule 1, vodu je bilo potrebno ohladiti na 40 – 50 °C, dok je kod pripreme dojenačke formule 3 vodu bilo potrebno ohladiti na 50 °C. Svi uzorci pripremljeni su u dječjim bočicama, naknadno označenim brojem od 1 do 6, ovisno o kojem se doziranju (prema starosti dojenčeta) dojenačke formule radi (slika 1).



Slika 1. Dječje bočice s pripremljenih 6 uzoraka, u ovom slučaju, dojenačke formule B (vlastita fotografija)

Nadalje, mali volumeni pripremljenih uzoraka dojenačkih formula prebačeni su u kivete, u kojima se zatim metodom NIR spektroskopije pomoću sonde NIR spektroskopa te prijenosnog NIR uređaja određivao spektar apsorbancije svakog pojedinog uzorka. Mjerene su i apsorbancije praškastih uzoraka dojenačkih formula, također uporabom sonde NIR spektrometra i prijenosnog NIR uređaja.

Načini pripreme pojedine dojenačke formule prikazani su u Tablicama 7 – 11.

Deklarirana prosječna masa		
mjerice (g)	4,3	
Broj pripremljenog uzorka	Broj dodanih mjerica	Volumen prokuhane vode (mL)
1	2	60
2	3	90
3	4	120
4	5	150
5	6	180
6	7	210

Tablica 8. Priprema dojenačke formule B

Deklarirana prosječna masa		
mjerice (g)	4,4	
Broj pripremljenog uzorka	Broj dodanih mjerica	Volumen prokuhane vode (mL)
1	2	60
2	3	90
3	4	120
4	5	150
5	6	180
6	7	210

Tablica 9. Priprema dojenačke formule C

Deklarirana prosječna masa		
mjerice (g)	7,3	
Broj pripremljenog uzorka	Broj dodanih mjerica	Volumen prokuhane vode (mL)
1	1	30
2	3	90
3	5*	150*

*Uzorak broj 3 formule C, prema uputama proizvođača, priprema se otapanjem 10 mjerica praha dojenačke formule u 300 mL vode. S obzirom na to da bočica tolikog volumena nije bila dostupna, doze koje proizvođač preporučuje prepolovljene su, tako da se 3. uzorak pripremio otapanjem 5 mjerica dojenačke formule u 150 mL ohlađene prokuhane vode. Na taj su način zadržane jednake koncentracije otopljenih tvari, a postignut je volumen prihvatljiv za uvjete u laboratoriju.

Tablica 10. Priprema dojenačke formule D

Deklarirana prosječna masa		
mjerice (g)	4,5	
Broj pripremljenog uzorka	Broj dodanih mjerica	Volumen prokuhane vode (mL)
1	3	90
2	4	120
3	5	150
4	7	210
5*	8*	240*

*Uzorak broj 5 formule D, prema uputama proizvođača, priprema se otapanjem 8 mjerica praha dojenačke formule u 240 mL vode. S obzirom na to da bočica tolikog volumena nije bila dostupna, doze koje proizvođač preporučuje prepolovljene su, tako da se 5. uzorak priprema otapanjem 4 mjerice dojenačke formule u 120 mL ohlađene prokuhane vode. Na taj bi se način zadržale jednake koncentracije otopljenih tvari te postigao volumen prihvatljiv za uvjete u laboratoriju. Međutim, s obzirom na to da se uzorak 2 priprema na jednak način (4 mjerice + 120 mL vode), uzorak broj 5 nije se pripremao.

Tablica 11. Priprema dojenačke formule E

Deklarirana prosječna masa		
mjerice (g)	4,4	
Broj pripremljenog uzorka	Broj dodanih mjerica	Volumen prokuhane vode (mL)
1	3	90
2	4	120
3	5	150
4	6	180

3.2. METODE

Dojenačke formule pripremljene su u zadanim volumenima pomoću prokuhane i ohlađene vodovodne vode.

U prilogu 1 i 2 prikazane su nutritivne i energetske vrijednosti dojenačkih formula te deklarirani sastav. Nutritivna i energetska vrijednost (prilog 1) prikazana je pomoću izrađene matrice, koja se sastojala od 8 stupaca i 57 redaka, u kojima su napisane informacije istovjetne nutritivnim deklaracijama ispitivanih dojenačkih formula. Prilog 2 u obliku matrice od 7 stupaca i 110 redaka prikazuje sastav dojenačkih formula, onako kako je sastav prikazan na pakiranju proizvoda.

3.2.1. Mjerenje vodljivosti i ukupne otopljene krute tvari

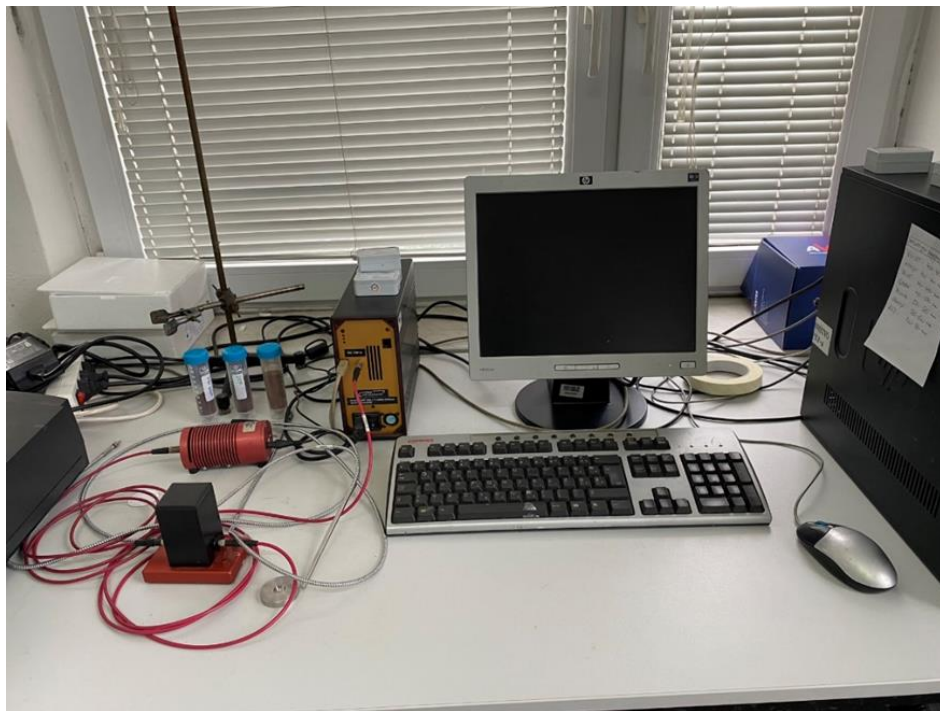
Pripremljenim dojenačkim formulama je praćena temperatura, električna vodljivost i sadržaj ukupne otopljene krute tvari (engl. *total dissolved solids* – TDS), Omron uređajem (SevenCompact. MettlerToledo, Švicarska). Električna vodljivost tekućina predstavlja potencijal vodenih otopina da prenose struju i proporcionalna je udjelu ukupne otopljene krute tvari u vodi (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017).

3.2.2. Blisko-infracrvena spektroskopija

Pipetmanom je volumen (4 mL) pripremljenih uzoraka dojenačkih formula prebačen u kivete koje su postavljene u pripadni držač s poklopcem.

Stolni NIR instrument

Korišten je procesni NIR spektrometar Control Development inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μm , s instaliranim Control Development softverom Spec32. Uzorci su snimani u kivetama, u tamnoj posudici (kako bi se minimizirao izvora svjetla okoline), primjenom sonde. Valno područje mjerenja je 904-1699 nm.



Slika 2. Laboratorijski NIR uređaj (vlastita fotografija)

Prijenosni NIR instrument

Korišten je mikro-NIR spektrometar (NIR-S-G1, InnoSpectra Corporation, Kina) za snimanje u apsorpcije uzoraka dojenačkih formula. Spektrometar, težine svega 70 g, snima u spektralnom rasponu od 900–1700 nm (točnosti ± 1 nm). Prema uputama proizvođača, preuzeta je aplikacija za prikupljanje i pohranjivanje spektralnih podataka i instalirana na Android tablet (ISC-NIRScan, InnoSpectra Corporation, Kina). Datoteke spektra pohranjene su na tabletu te su zatim prebačene na računalo putem bežične mreže.



Slika 3. Prijenosni NIR instrument za tekuće uzorke (Ćorić, 2023)

Na oba NIR uređaja su spektri mjereni u triplikatu.

3.2.3. Mjerenje boje

Boja uzoraka mjerena je pomoću kolorimetra, tako što su se kivete svakog uzorka postavile u kolorimetar te su se potom očitale izmjerene vrijednosti. Korišten je uređaj CM-700d (Konica Minolta Sensing INC, New York, USA). CIE (franc. *Commision Internationale de l'Eclairage*) je internacionalna komisija za rasvjetu, utemeljitelj znanosti o boji, razumijevanju nastanka boje, njezina instrumentalnog mjerenja i brojčanog vrednovanja te je 1976. godine preporučila korištenje CIE $L^*a^*b^*$ ili CIELAB skale boja. Stoga je u CIELAB prostoru boja mjerena svjetlina (L^*) te a^* i b^* , gdje pozitivna vrijednost za a^* predstavlja dominaciju crvene, a negativna vrijednost-zelene, dok pozitivna vrijednost za b^* ukazuje na dominaciju žute, a negativna vrijednost-plave (HunterLab, 2008).

Također su računate razlike: ΔL^* , Δa^* i Δb^* , koje ukazuju na odstupanje uzorka od standarda (mlijeka u prahu). Ukupna razlika boja, ΔE^* izračunava se iz vrijednosti ΔL^* , Δa^* i Δb^* . Navedeni parametri se izračunavaju na sljedeći način:

$$\Delta L^* = L^* \text{ uzorka} - L^* \text{ standarda} \quad [1]$$

Pozitivan ΔL^* : uzorak je svjetliji od standarda; negativan: uzorak je tamniji od standarda.

$$\Delta a^* = a^* \text{ uzorka} - a^* \text{ standarda} \quad [2]$$

Pozitivan Δa^* : uzorak je crveniji od standarda, negativan: uzorak je zeleniji od standarda.

$$\Delta b^* = b^* \text{ uzorka} - b^* \text{ standarda} \quad [3]$$

Pozitivan Δb^* : uzorak je žući od standarda, negativan: uzorak je više plav nego standard.

$$\Delta E^* = \Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [4]$$

Za vrijednosti $\Delta E < 0,2$: razlika boja nije vidljiva; u rasponu od 0,2 do 1: razlika boja se zamjećuje; u rasponu od 1 do 3: razlika boja se vidi; od 3 do 6 - razlika boja se dobro vidi; za vrijednosti veće od 6: odstupanja boja je očigledna (Schläpfer, 1993).

Također su mjerene vrijednosti tona boje (Hue) i zasićenje (Chroma), ton i zasićenje boje određuju kromatičnost boje koja ne ovisi o svjetlini (Strgar Kurečić, 2023).

3.2.4. Obrada podataka

Za mjerene podatke su računate srednje vrijednosti i standardne devijacije. Pri obradi spektralnih podataka koristio se MS Excel i dodatni program – XL STAT (*Free Trial* verzija) te su upotrijebljeni alati multivarijatne analize: (i) analiza glavnih komponentata (engl. *Principal Component Analysis*, *PCA*) te (ii) regresija glavnih komponentata (engl. *Principal Component Regression*, PCR), i to na matricama dimenzija 813 stupaca i 120 redaka (za laboratorijski NIR) te 228 stupaca i 120 redaka (za prijenosni NIR). Primjenjivost modela je procijenjena na temelju sljedećih parametara: koeficijent determinacije (R^2), relativna standardna pogreška predikcije (RSEP (%)), standardna pogreška predikcije (RPD), omjer standardne pogreške predikcije i raspona mjernih podataka (RER) (Sun i sur., 2021).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati su podijeljeni u šest skupina, koje prikazuju sljedeće podatke: (i) mase mjerica, (ii) sastav makronutrijenata i energetski sastav, (iii) boje uzoraka dojenačkih formula, (iv) vodljivost uzoraka dojenačkih formula, (v) analizu pomoću NIR spektroskopije te (vi) kemometriju.

Mase mjerica (slika 3) i odstupanja u deklariranim masama i masama vrhom punih mjerica (slika 8) prikazane su pomoću stupičastih dijagrama. Kroz priložene dijagrame nastojat će se uočiti razlike u odstupanju od deklaracije između različitih proizvođača te pokušati doći do zaključaka o netransparentnosti unosa energije i nutrijenata, uzrokovane odstupanjima mase mjerice od deklaracije.

U drugoj skupini rezultata, pomoću kružnih dijagrama, prikazan je sastav makronutrijenata (proteina, ugljikohidrata i masti) u pojedinoj dojenačkoj formuli, a stupičastim dijagramima prikazan je energetski unos po bočici dojenačke formule, ovisno o dobi djeteta, prema uputama na pakiranju. Kroz ove će se dijagrame pokušati uočiti sličnosti ili razlike u sastavu makronutrijenata te u energetske unosu između različitih dojenačkih formula te će se pokušati doći do zaključaka.

Treća skupina rezultata pomoću stupičastih dijagrama donosi podatke o L^* , a^* , b^* , h i C vrijednostima izmjerenim za sve uzorke dojenačkih formula, a pomoću radar-dijagrama prikazuje odstupanja u boji uzoraka dojenačkih formula od boje mlijeka u prahu. Osim prikazanog odstupanja u boji, dobiveni podatci omogućit će usporedbu boje mlijeka, kako među uzorcima iste dojenačke formule, tako i među uzorcima različitih dojenačkih formula.

Kroz četvrtu skupinu rezultata stupičastim dijagramima prikazani su podatci o vodljivosti uzoraka dojenačkih formula te o količini otopljenih tvari. Cilj je ustvrditi jesu li navedena dva parametra približno konstantna, odnosno, postoje li odstupanja među uzorcima.

Sa ciljem da se prikupljeni podatci o makronutritivnom i energetske sastavu povežu s molekularnom razinom svake dojenačke formule, provedena je i potrebna analiza uzoraka primjenom NIR spektroskopije. Dobiveni NIR dijagrami prikazani su u petoj skupini rezultata.

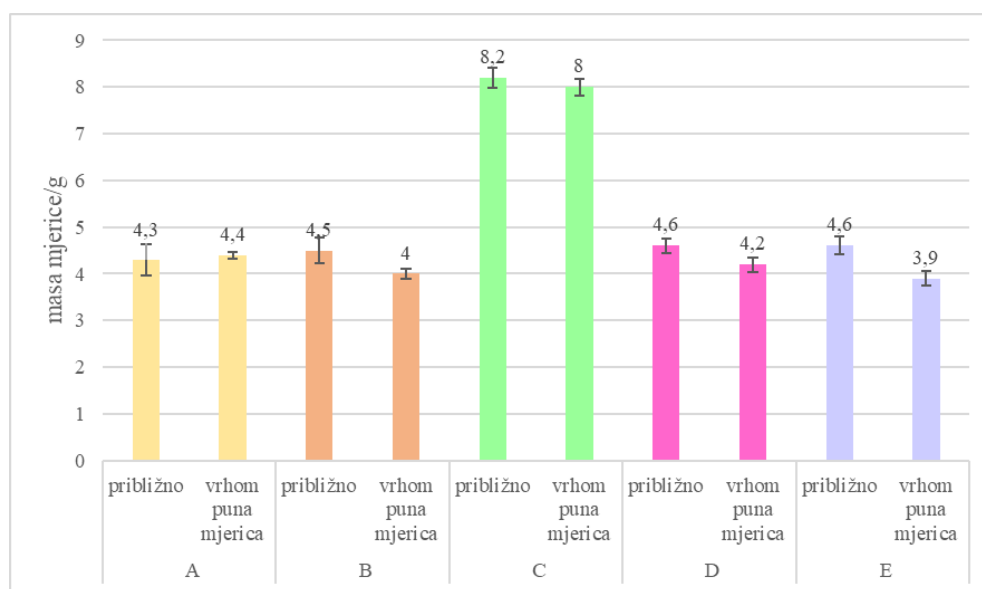
Šesta skupina rezultata odnosi se na kemometrijsku analizu prikupljenih podataka, koja omogućuje dobivanje maksimalnog broja podataka s većom preciznošću. Korištene su dvije kemometrijske metode: analiza glavnih komponenata (PCA) i regresija glavnih komponenata (PCR).

4.1. MASE MJERICA

Mjerile su se mase mjerica priloženih uz svaku od pet dojenačkih formula. Svaka se odvaga ponovila pet puta te je potom izračunata srednja vrijednost mase približno uzete i vrhom pune mjerice. Prosječne mase vrhom punih mjerica zatim su uspoređene s masama mjerica navedenim na deklaraciji proizvoda.

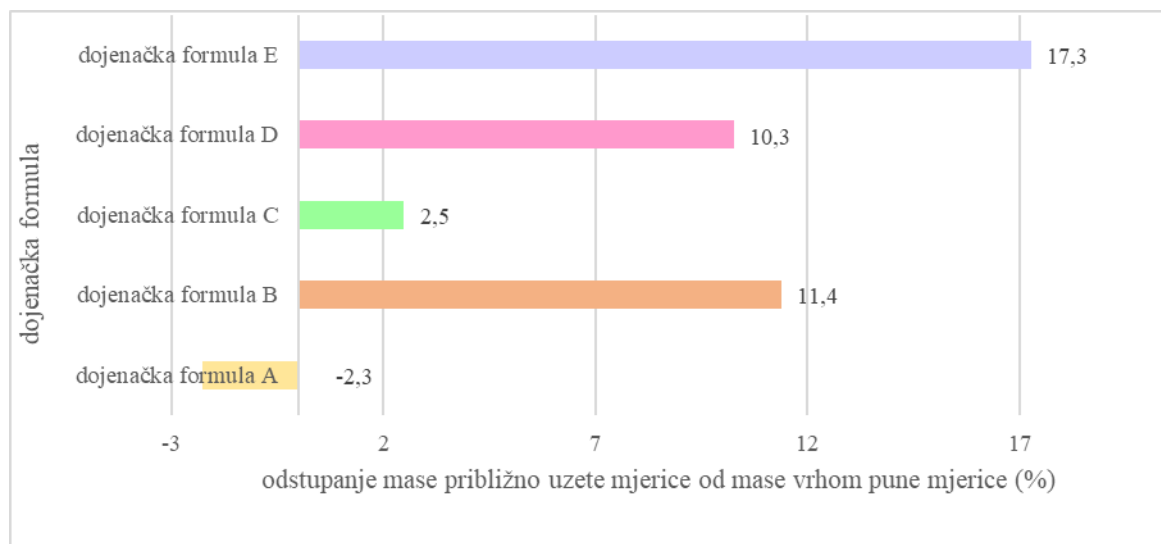
4.1.1. Usporedba masa otprilike uzetih i vrhom punih mjerica

Za prikaz prosječnih masa mjerica korišten je stupičasti dijagram (slika 4 i 5).



Slika 4. Razlika u odvagama vrhom punih i približno uzetih mjerica

S obzirom na to da se na pakiranju proizvoda navodi masa vrhom pune mjerice, očekuje se da se za pripremu obroka koristi upravo vrhom puna mjerica. Ako se u obzir uzme da dio roditelja ipak ne uzima vrhom pune mjerice, nego ih približno napuni prahom dojenačke formule, važno je istaknuti da u tom slučaju dolazi do promjene mase formule u mjerici i da se, sukladno tome, mijenja i energetska sastav obroka dojenčeta.



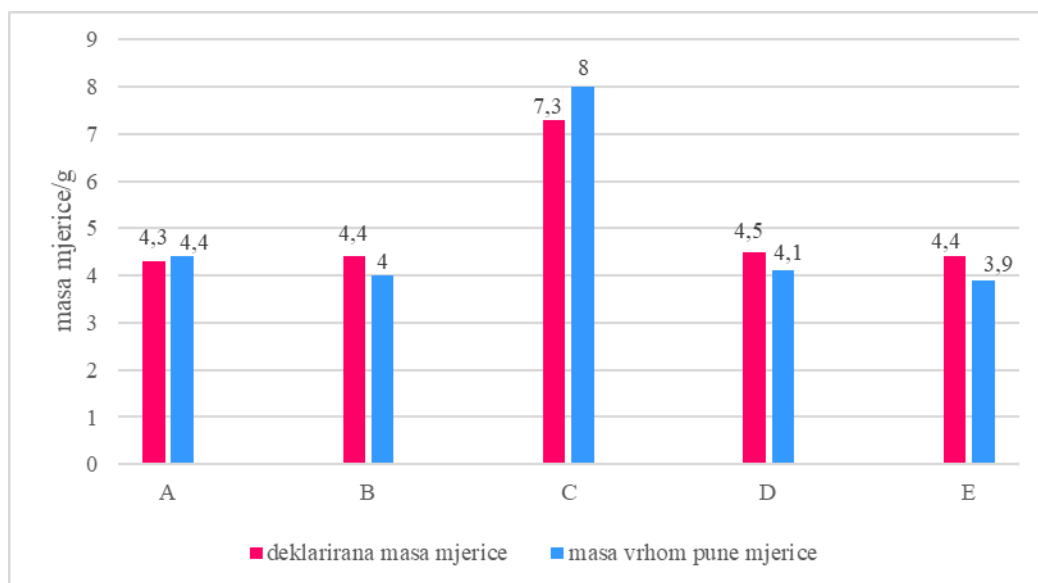
Slika 5. Odstupanje mase približno uzete mjerice od mase vrhom pune mjerice

Rezultati dobiveni obradom podataka o masi uzoraka pokazuju odstupanja u smjeru prevelike približno odmjerene mase formule, u odnosu na vrhom punu mjericu. Suprotno je primijećeno jedino kod uzorka A, gdje je masa približno uzete mjerice za 2,3 % manja od mase vrhom pune mjerice. Masa približno uzete mjerice uzoraka B, C, D i E u prosjeku je 10,3 % veća od mase vrhom pune mjerice. Dakle, četiri od pet bočica (80,0 %) sadržavalo bi 10,3 % više formule od upute na pakiranju. Upravo je ova problematika bila povod istraživanja Altazan i sur. (2019), čiji rezultati pokazuju da je 19 % bočica bilo pripremljeno sukladno prema uputama, 3,0 % je sadržavalo premalo formule, dok je njih 78 % bilo prezasićeno formulom, točnije, sadržavalo je 11,0 % formule više od preporučenog.

Ako se tome pridoda i mogućnost pogreške uzrokovana netočnim označavanjem volumena na dječjim bočicama, koja također može dovesti do neispravne i neprecizne pripreme bočice (Gribble i sur., 2017), nesumnjivo je da će obrok biti energetski preobilan za dijete, što doprinosi riziku od razvoja pretilosti (Altazan, 2019).

4.1.2. Usporedba masa vrhom punih mjerica i deklariranih masa mjerica

Mase vrhom punih mjerica u odnosu na deklarirane mase prikazane su stupičastim dijagramima.



Slika 6. Razlika u masama deklarirane mase mjerice i mase vrhom pune mjerice



Slika 7. Odstupanje mase vrhom pune mjerice od deklarirane mase mjerice

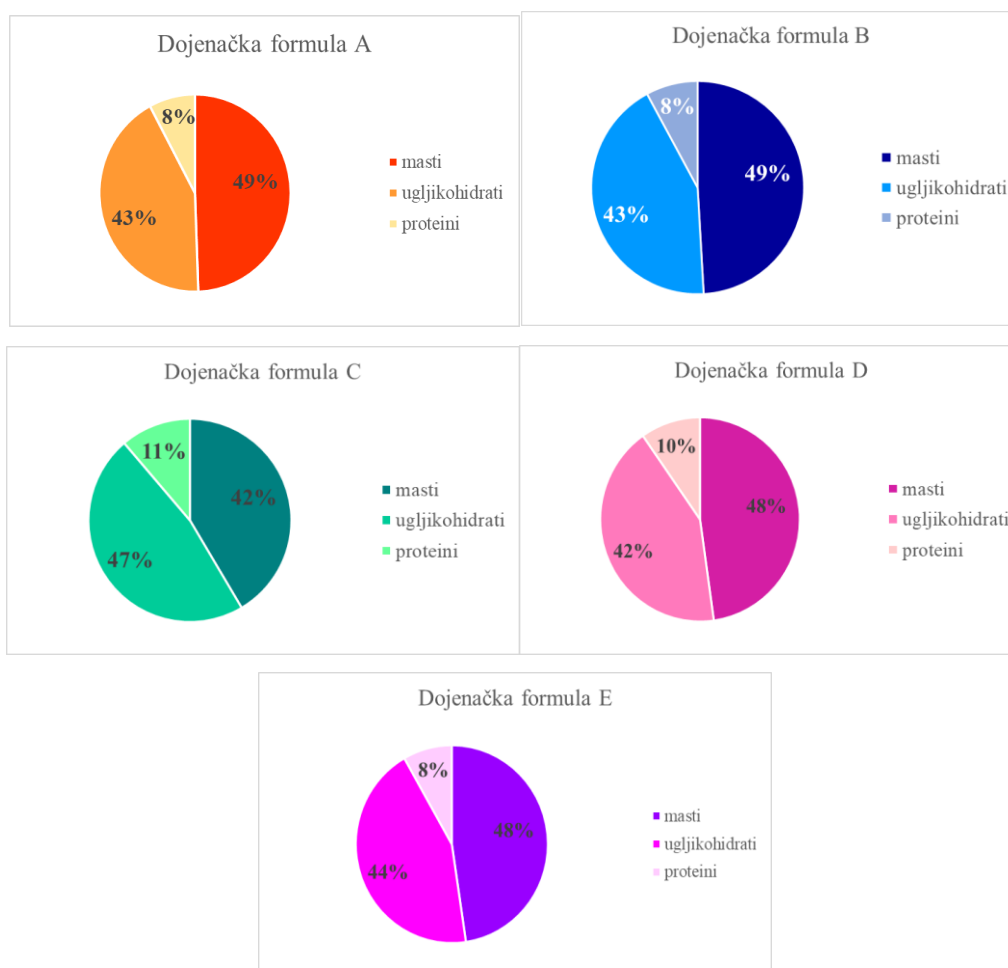
Iz rezultata prikazanih dijagramima (slike 6 i 7) vidljivo je da su kod svih uzoraka dojenačkih formula prisutne razlike između deklarirane mase vrhom pune mjerice i realne mase vrhom pune mjerice. Uzorci A i C imaju veću realnu masu vrhom pune mjerice od mase koja je deklarirana te je realna masa uzorka C čak 9,3 % veća od deklarirane. Uzorcima B, D i E realna masa vrhom pune

mjerice manja je od deklarirane, a ta je razlika najistaknutija kod uzorka E, kojemu je realna masa 10,5 % manja od deklarirane.

4.2. MAKRONUTRITIVNI I ENERGETSKI SASTAV DOJENAČKIH FORMULA

S obzirom na podatke o energiji i makronutrijentima navedenim na deklaraciji, izračunate su vrijednosti energetskog i makronutritivnog sastava, s obzirom na dob dojenčeta. Pritom su u obzir uzeta odstupanja masa mjerica.

4.2.1. Sastav makronutrijenata



Slika 8. Zastupljenost makronutrijenata u uzorcima dojenačkih formula

Tri dojenačke formule (A, B i C) imaju jednaku zastupljenost proteina (8 %), dok se dojenačke formule C i D neznatno razlikuju (dojenačka formula C sadrži 11 % proteina, a dojenačka formula D sadrži 10 % proteina) (slika 8). Zastupljenost ugljikohidrata slična je kod četiri od pet dojenačkih formula te kod dojenačke formule D iznosi 42 %, kod formula A i B iznosi 43 %, a kod dojenačke

formule C je nešto viša te iznosi 47 %. Masti su najzastupljenije u dojenačkim formulama A i B (49 %), zatim u dojenačkim formulama D i E (48 %), a najmanje su prisutne u dojenačkoj formuli C (42 %). Glavne razlike makronutritivnog sastava ispitivanih dojenačkih formula su razlika u obliku sadržanih proteina i u izvoru ugljikohidrata. Formule A i B kao izvor proteina sadrže kravlje mlijeko i sirutku u prahu. U dojenačkoj formuli C glavni izvor proteina su aminokiseline, dok izvor proteina u dojenačkoj formuli D predstavlja hidrolizat mliječnih bjelančevina. Dojenačka formula E kao izvor proteina sadrži punomasno kozje mlijeko u prahu. Što se tiče izvora ugljikohidrata, u formuli A to je laktoza, dok su u formuli B izvori ugljikohidrata laktoza i škrob. Dojenačka formula C kao izvor ugljikohidrata sadrži suhi glukozni sirup, a formula D maltodekstrin i tapioka škrob. Dojenačka formula E kao ugljikohidratnu osnovu sadrži maltodekstrin i laktozu.

Iz dobivenih rezultata jasno je vidljivo da ne postoji uniformnost u makronutritivnom sastavu različitih dojenačkih formula, različitih proizvođača. S obzirom na činjenicu da se o utjecaju sastava makronutrijenata u dojenačkim formulama na rast i razvoj djeteta ne zna mnogo, ostaje puno prostora za istraživanje. Međutim, neka provedena istraživanja posljednjih godina ukazuju na problematiku varijacija makronutritivnog sastava i različite učinke do kojih u dojenčeta može doći, upravo zbog neujednačenog omjera makronutrijenata u formulama. Ono što je zasad poznato je da razlike u omjeru makronutrijenata među formulama mogu različito djelovati na antropometrijske parametre dojenčadi (Young, 2020). Mennela i sur. (2022) pokazali su da postoji poveznica između proteinske osnove dojenačke formule i tjelesne mase i visine dojenčeta, odnosno, da dojenčad hranjena dojenačkom formulom na bazi kravljeg mlijeka ima brži porast tjelesne mase i visine u prva četiri mjeseca života, za razliku od dojenčadi hranjene formulama na bazi proteinskih hidrolizata. Također, dokazano je da je veći udio proteina u mlijeku ima utjecaj na razvoj pretilosti. Sadržaj proteina u majčinom mlijeku s vremenom se smanjuje, dok je sadržaj proteina u dojenačkim formulama konstantan, što se smatra potencijalnim faktorom rizika za razvoj pretilosti u dječjoj dobi (Kouwenhoven i sur., 2022). S druge strane, primijećeno je da crijevna mikrobiota dojenčadi hranjene formulom na bazi proteinskih hidrolizata koja brže sazrijeva te da postoji jasna veza između omjera makronutrijenata i raznolikosti crijevnih mikrobiota te rasta i razvoja dojenčeta.

4.2.2. Energetska vrijednost



Slika 9. Promjene energetske vrijednosti uzoraka ovisno o dobi djeteta

Sve dojenačke formule najviše energije osiguravaju oko šestog mjeseca života (slika 9). Kod dojenačkih formula A i B primjetan je podjednak rast sadržaja energetske vrijednosti po danu, sukladno dobi. Nakon šestog mjeseca života karakterističan je pad energetske vrijednosti putem dojenačke formule (Babycentre, 2021), s obzirom na to da, zbog uvođenja dohrane, dojenačka formula više nije jedini izvor energije i nutrijenata. Dojenačka formula D bilježi pad unosa energije nakon šestog mjeseca života, što je karakteristično za navedenu dob djeteta, međutim, dojenačke formule A, B i

E taj pad ne bilježe. U njih se detektira nastavak najvišeg unosa energije i nakon šestog mjeseca života, odnosno, proizvođač u uputama ne prilagođava preporuku unosa dojenačke formule činjenici da ona, uslijed uvođenja dohrane, više nije isključiva hrana za dijete. Dojenačka formula C namijenjena je djeci starijoj od godinu dana pa je stoga energija koju osigurava uspoređena s dojenačkom formulom D, primjenjivom do treće godine života djeteta te je unos energije ovim dvjema formulama približno sličan.

FAO je 2004. predstavio rezultate vlastitog izračuna potreba energetskeg unosa za dojenčad, odnosno djecu do godine dana starosti. Tablica 11 prikazuje usporedbu navedenih preporuka s energetskeg unosom koji se ostvaruje istraživanim dojenačkim formulama. S obzirom na to da FAO svoje preporuke izražava u kcal/kg TM/dan, za potrebe ovog izračuna korištene su tjelesne mase dojenčadi sukladno 50. percentilu na percentilnim krivuljama (prilog 1).

Tablica 11. Usporedba izračuna energetskeg unosa koji preporučuje FAO i energetskeg unosa dojenačkim formulama, pomoću percentilnih krivulja

	Dob (mjeseci)							
Dojenačka formula	3		6		9		12	
A	561,0		620,4		620,4		/	
B	569,5		629,8		629,8		/	
C	/		/		/		450,0	
D	569,5		629,8		472,4		469,0	
E	561,0		680,0		680,0		/	
Spol (TM/kg)	Dječaci (6,4)	Djevojčice (5,8)	Dječaci (8,0)	Djevojčice (7,2)	Dječaci (8,9)	Djevojčice (8,2)	Dječaci (9,6)	Djevojčice (9)
FAO (kcal/dan)	640,0	585,8	664,0	612,0	664,2	664,2	787,2	729,0

Ispitivane dojenačke formule za dob od tri mjeseca osiguravaju podjednak dnevni energetskeg unos, koji prosječno iznosi 565,3 kcal, što je 54,2 kcal (11,7 %) niže od preporuke Organizacije za

prehranu i poljoprivredu za unos u dječaka (640,0 kcal) , a prosječan ostvareni energetske unos za djevojčice iste dobi je za 20,5 kcal (3,5 %) niži od preporuke (585,8 kcal).

Za dob od šest mjeseci ispitivanim dojenačkim formulama unosi se prosječno 640,0 kcal, međutim, dojenačke formule A, B i D osiguravaju dnevni unos u rasponu od 620,0 do 630,0 kcal, dok dojenačka formula E odstupa od ovih unosa i osigurava dnevni unos od 680,0 kcal. Muška dojenčad dobi od šest mjeseci prema FAO-u dnevno treba unijeti 664,0 kcal, što je za 24 kcal (3,8 %) više od prosječnog unosa ispitivanim formulama. Točnije, formule A, B i D ne zadovoljavaju unos koji je za dječake preporučio FAO, jer se njima ostvaruje, u prosjeku, za 37,3 kcal (5,6 %) manji energetske unos u danu. Formula E pak premašuje preporučeni dnevni energetske unos te se njome u danu osigurava 16,0 kcal više od preporuke, tj. 2,4 % veći unos od preporučenog. S druge strane, ženska dojenčad u dobi od šest mjeseci prema FAO-u treba ostvariti dnevni unos od 612,0 kcal, što znači da se ispitivanim dojenačkim formulama unosi 4,6 % više energije dnevno od preporučenog.

U dobi dojenčeta od 9 mjeseci FAO preporučuje dnevni energetske unos od 664,2 kcal i za dječake, i za djevojčice. Dojenačka formula A osigurava unos od 620,4 kcal na dan (43,8 kcal, tj. 6,6 % manje od preporuke), dojenačka formula B osigurava dnevni energetske unos od 629,8 kcal (34,4 kcal, tj. 5,2 % manje od preporuke), a dojenačkom formulom E dnevno se osigura unos od 680,0 kcal (15,8 kcal, tj. 2,4 % više od preporuke). Dojenačka formula D značajno odstupa od navedenih energetske unosa te se njome dnevno osigurava energetske unos od 472,4 kcal, što je značajno smanjenje energetske unosa, koje se može obrazložiti uvođenjem dohrane (Babycentre, 2021). Ipak, energetske unos ostvaren dojenačkom formulom D je za 191,8 kcal (28,9 %) manji od unosa koji preporučuje FAO.

Zanimljivo je da dojenačke formule A i B na svojim deklaracijama navode kako se broj bočica u danu, a time i energetske unos putem dojenačke formule, treba smanjivati otprilike nakon navršenog petog mjeseca života djeteta, zbog uvođenja dohrane, ali iz slike 8 i tablice 11 vidljivo je da preporučeni broj bočica, pripremljen prema uputi za dojenče od devet mjeseci, zadržava jednaku energetske vrijednost kao i energetske unos putem dojenačke formule za dojenče od šest mjeseci.

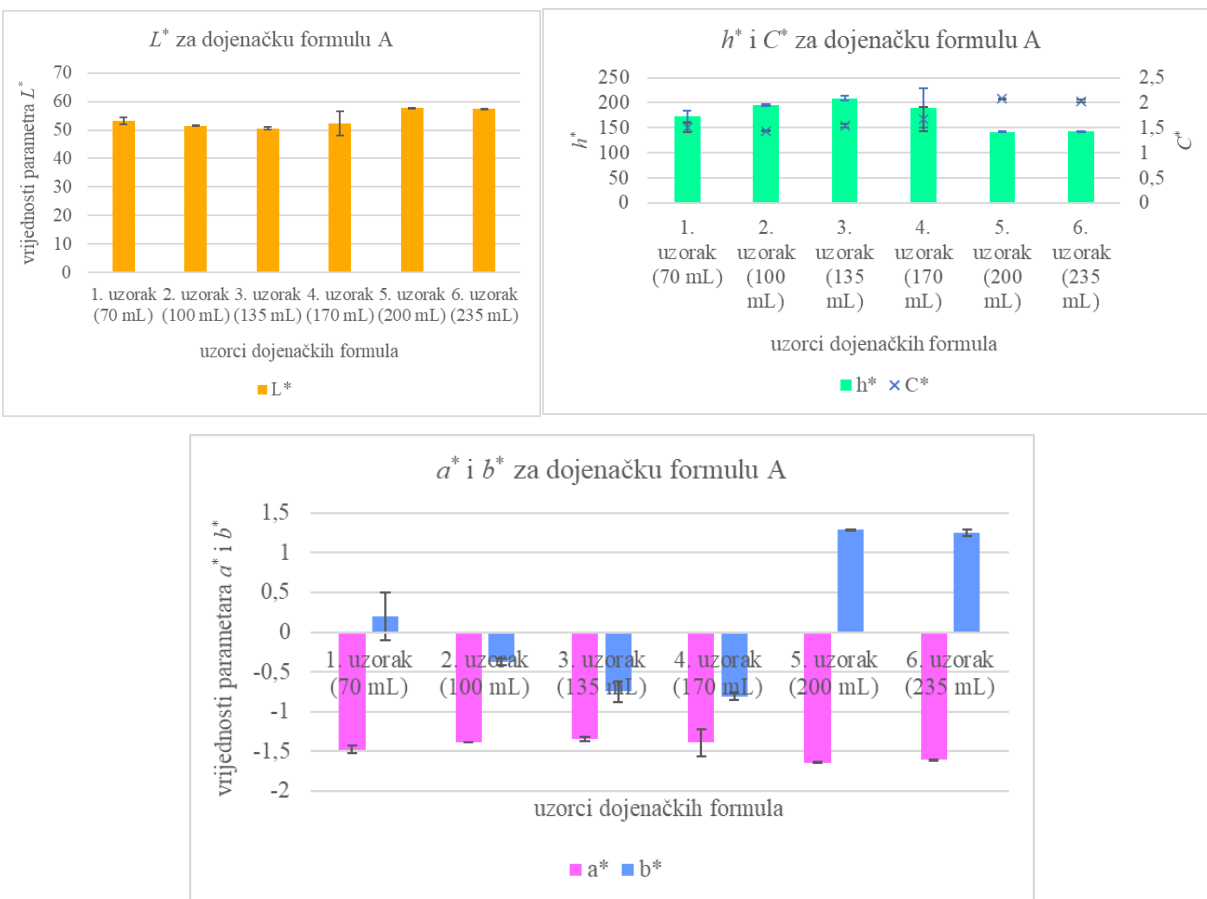
Za dob od 12 mjeseci FAO preporučuje dnevni energetske unos od 787,2 kcal za dječake, odnosno 729,0 kcal za djevojčice. Dojenačkom formulom C unosi se 450,0 kcal dnevno, što je 337,2 kcal (42,8 %) manji unos od preporučenog za dječake te 279,0 kcal (38,3 %) manji unos od

preporučenog za djevojčice. Dojenačka formula D osigurava dnevni energetska unos od 469,0 kcal, što je 318,2 kcal (40,4 %) manji unos od preporučenog za dječake i 260,0 kcal (35,7 %) manji unos od preporučenog za djevojčice. Ovdje je bitno naglasiti da dojenačku formulu C dozira pedijatar te se za potrebe istraživanja dnevni energetska unos procjenjivao pomoću dnevnog energetska unosa dojenačke formule D, koji je naveden na deklaraciji proizvoda.

4.3. BOJE UZORAKA DOJENAČKIH FORMULA

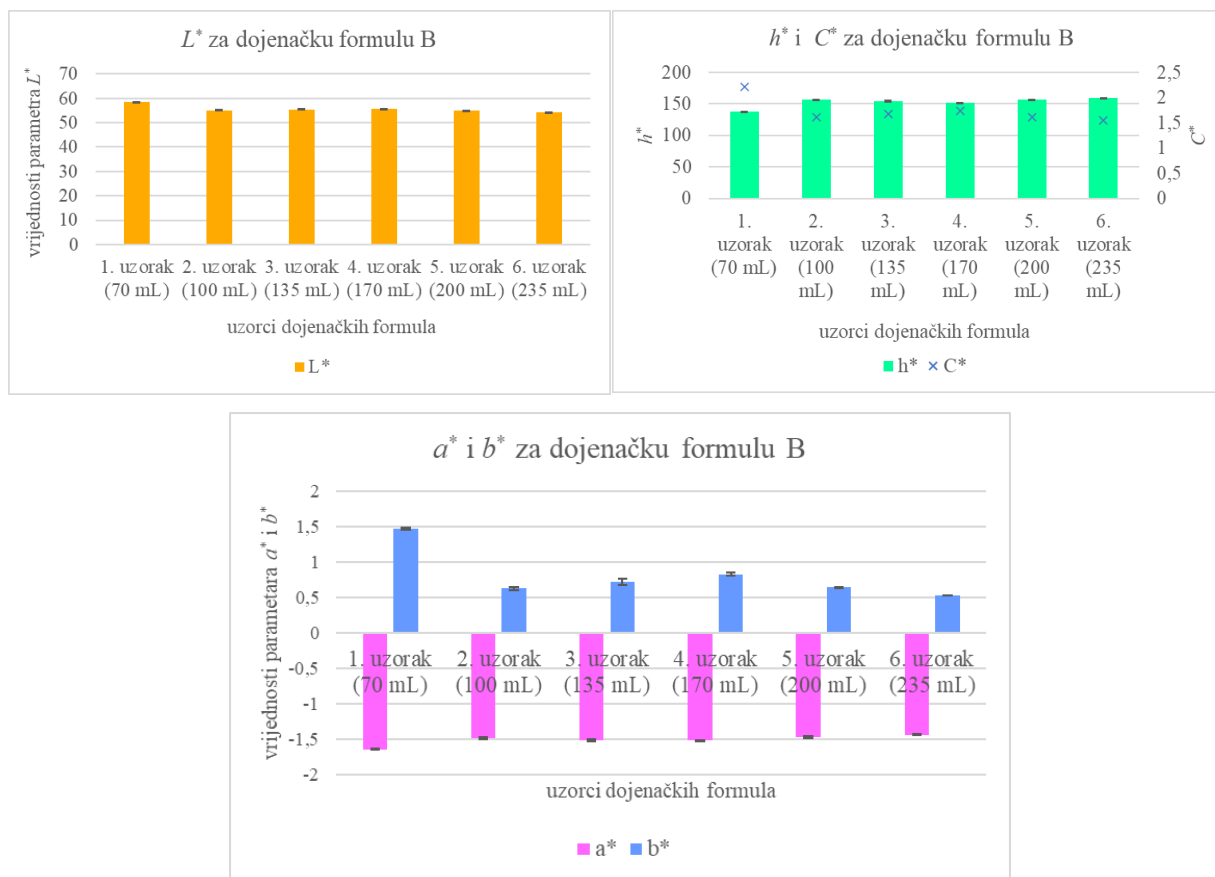
4.3.1. Kolorimetrijska analiza

Prema Chudy i sur. (2020), L^* je parametar svjetline boje, čije se vrijednosti kreću u rasponu od 0 do 100, pri čemu vrijednost jednaka nuli predstavlja crno (potpuno tamno), vrijednost oko 50 znak je sivih tonova, a vrijednost 100 znači bijelo (najsvjetlije). Parametri a^* i b^* predstavljaju kretanje boje i to od crvene ($+a^*$) prema žutoj ($+b^*$) pa do zelene ($-a^*$) i plave ($-b^*$), što je usporedivo sa spektrom bijele svjetlosti nakon prolaska kroz prizmu. Parametar C^* predstavlja kromatičnost (zasićenost). Što je vrijednost C^* veća, to je jača i čistija boja ispitivanog predmeta i obratno, što je vrijednost C^* manja, to je boja blijeda. Posljednji mjereni parametar, h^* , zapravo je atribut boje koji predstavlja nijansu ili ton.



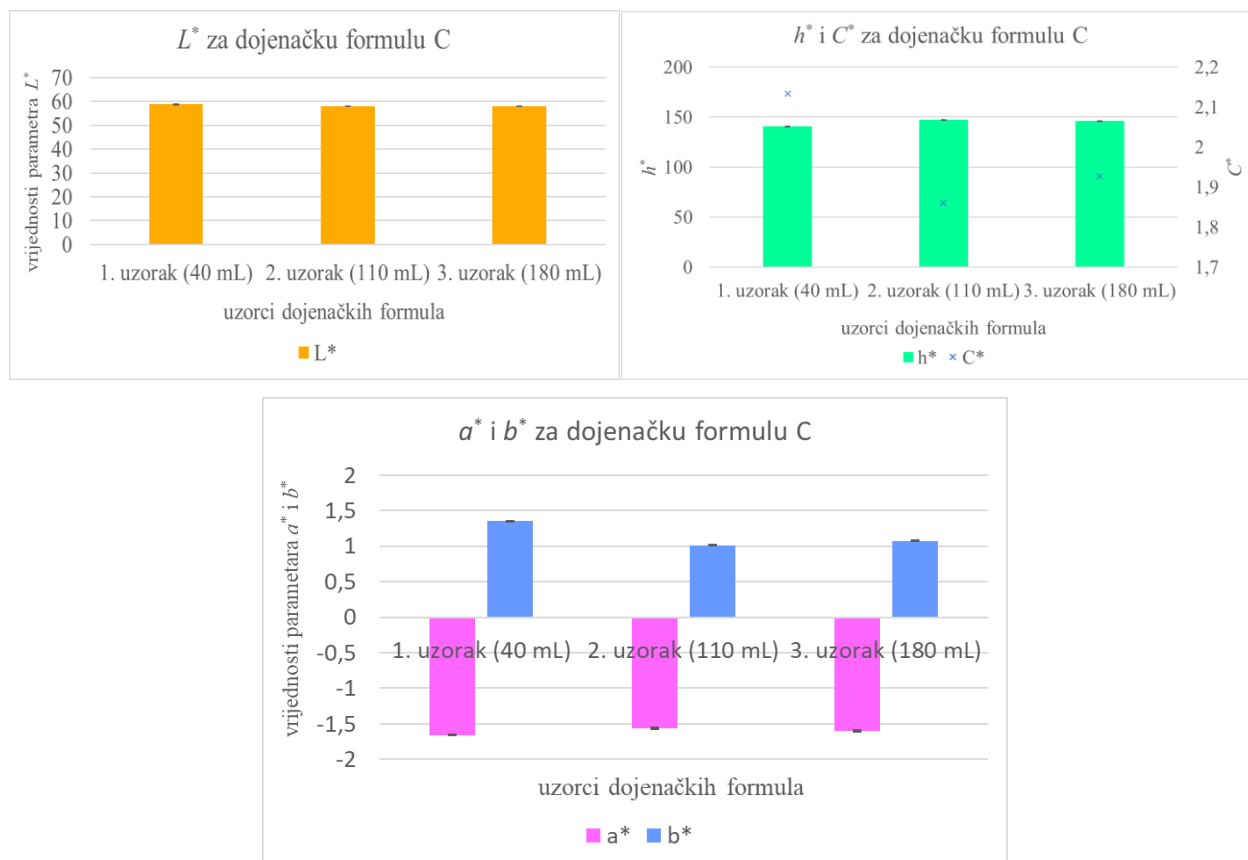
Slika 10. Vrijednosti L^* , a^* , b^* , h^* , C^* za dojenačku formulu A

Svi uzorci dojenačke formule A podjednako su svijetli (vrijednost L^* varira između 50,6 za uzorak 3 i 57,7 za uzorak 5) (slika 10). Vrijednost parametra a^* kod svih je uzoraka ove dojenačke formule negativna i poprima vrijednosti između -1,3 i -1,6, što govori o dominaciji zelene boje. Vrijednost parametra b^* za uzorke 2, 3 i 4 je negativna (iznosi -0,4 za uzorak 2 i -0,8 za uzorak 4), dakle, uz zelenu je dominantna plava boja, dok je vrijednost parametra b^* za uzorke 1, 5 i 6 pozitivna (iznosi 0,2 za uzorak 1 i 1,3 za uzorak 5), odnosno, uz zelenu je dominantna žuta boja. Nijansa boje (h^*) varira između 141,8 (uzorak 5) i 209,0 (uzorak 3) te nije ujednačena za sve uzorke. Zabilježena su i odstupanja u kromatičnosti, koja se kreće od 1,4 (uzorak 2) do 2,1 (uzorak 5), dok je upravo za taj uzorak nijansa najslabije izražena.



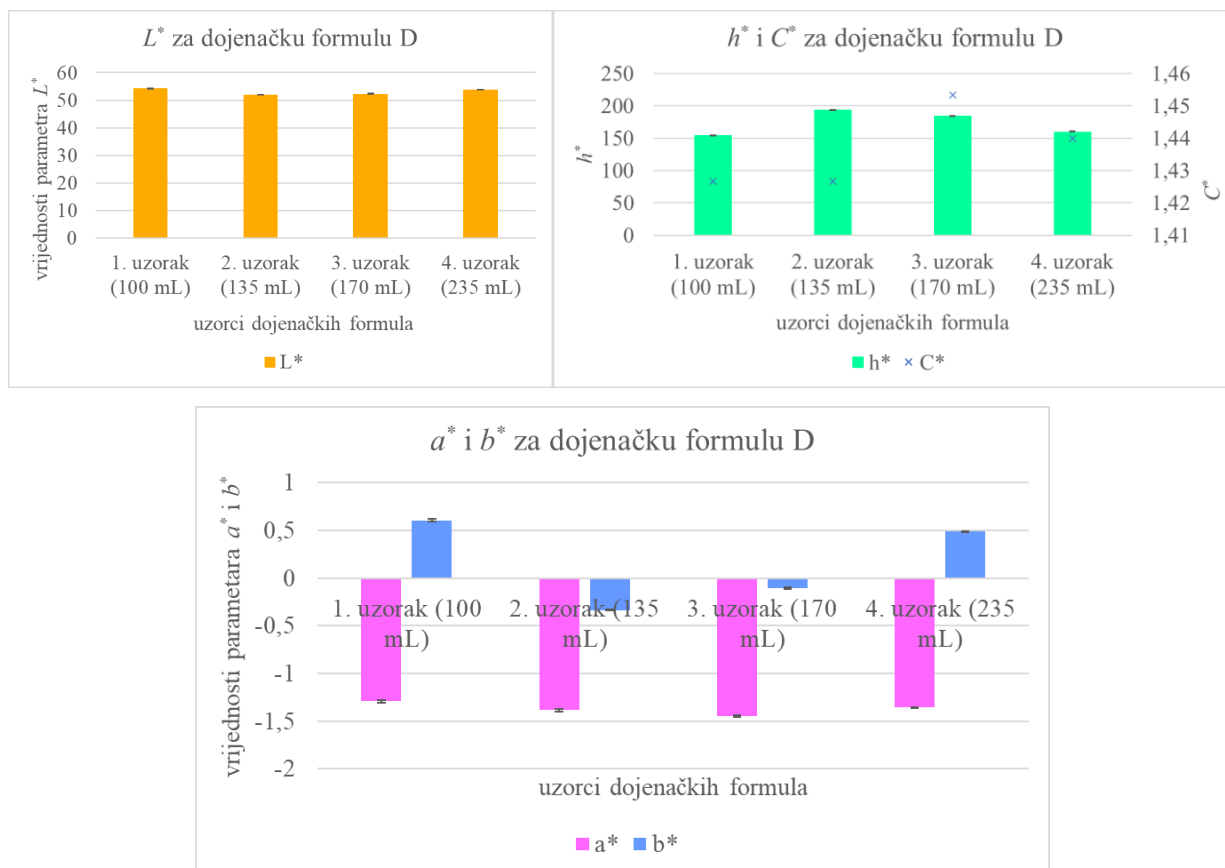
Slika 11. Vrijednosti L^* , a^* , b^* , h^* , C^* za dojenačku formulu B

Svi uzorci dojenačke formule B bilježe svjetlinu u rasponu od 54,3 (uzorak 6) do 58,4 (uzorak 1), što znači da je detektirana srednja svjetlina uzoraka, odnosno sivi tonovi (Slika 11). Vrijednosti parametra a^* su negativne za sve uzorke i prilično su ujednačene (iznose približno -1,5), što govori o dominaciji zelene boje. Najveću vrijednost parametar a^* poprima u uzorku 6, gdje iznosi -1,4, a najmanju u uzorku 1, gdje iznosi -1,7. Vrijednosti parametra b^* pozitivne su za sve uzorke i kreću se u rasponu od 0,5 (uzorak 6) do 1,5 (uzorak 1), što znači da je u svim uzorcima, uz zelenu, dominantna žuta boja. Nijansa boje uzoraka (h^*) varira od 138,2 (uzorak 1) do 159,8 (uzorak 6) te je, dakle, najslabije izražena u uzorku 1, a upravo je u tom uzorku detektirana najveća kromatičnost ($C^* = 2,2$). Uzorak 6 ima najjače izraženu nijansu boje ($h^* = 159,8$) i najmanju kromatičnost: $C^* = 1,5$.



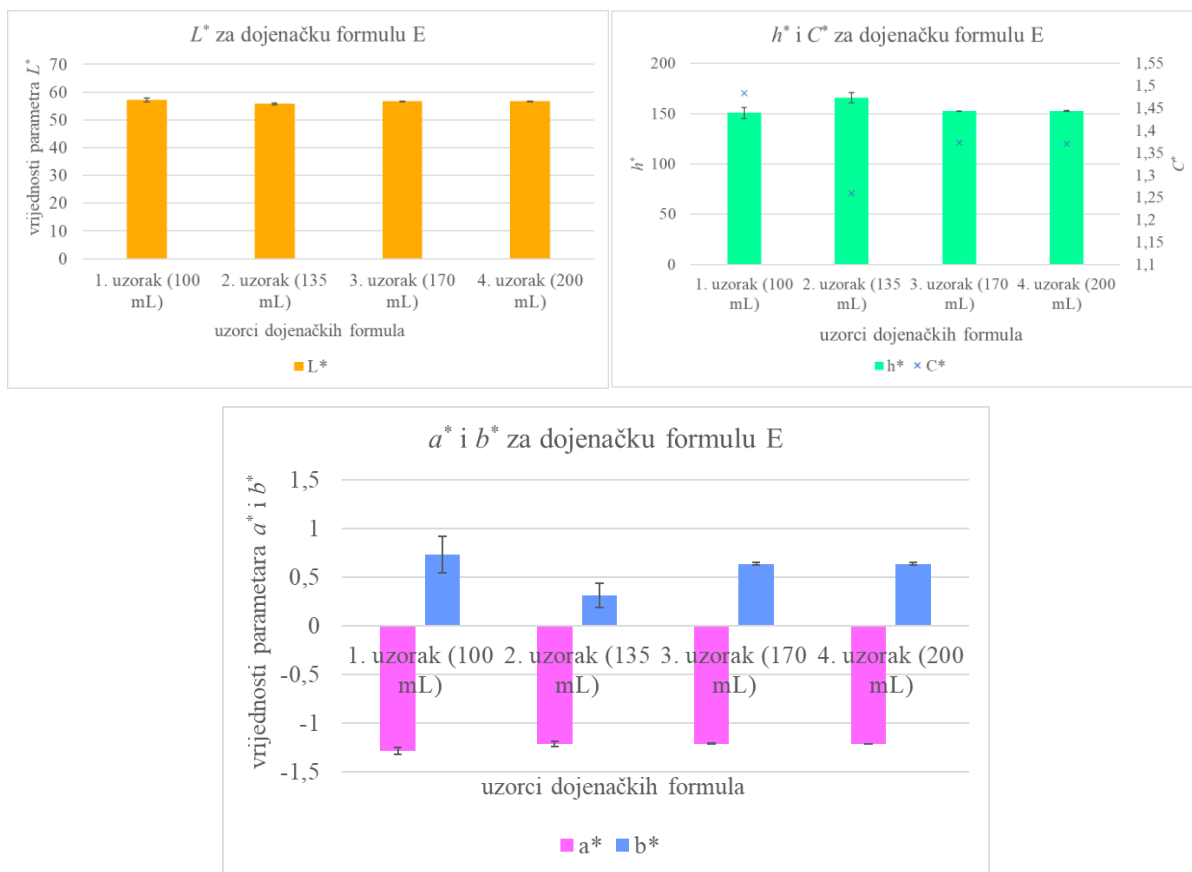
Slika 12. Vrijednosti L^* , a^* , b^* , h^* , C^* za dojenačku formulu C

Vrijednosti parametra L^* za sva tri uzorka dojenačke formule C^* prilično su ujednačene i kreću se između 57,9, za uzorak 2, i 59,0 za uzorak 1, što govori o detektiranoj srednjoj svjetlini, odnosno sivim tonovima (Slika 12). Vrijednost parametra a^* za sva tri uzorka je prilično ujednačena i kreće se između -1,7 (uzorak 1) i -1,6 (uzorak 2). Negativna vrijednost govori o dominaciji zelene boje. Vrijednost parametra b^* pozitivna je za sva tri uzorka i kreće se između 1,0 (uzorak 2) i 1,4 (uzorak 1), a njegova pozitivna vrijednost marker je dominacije žute boje. Najniža vrijednost nijanse uzorka iznosi 140,8 (uzorak 1), a najviša je za uzorak 2 te iznosi 147,0. Najveća kromatičnost detektirana je kod uzorka 1 ($C^* = 2,1$), a najmanja kod uzorka 2 ($C^* = 1,9$).



Slika 13. Vrijednosti L^* , a^* , b^* , h^* , C^* za dojenačku formulu D

Vrijednosti parametra L^* za dojenačku formulu D kreću se od 51,9 (uzorak 2) do 54,4 (uzorak 1), što odgovara srednjem rasponu vrijednosti svjetline, odnosno sivim tonovima (slika 13). Vrijednosti parametra a^* negativnog su predznaka, ujednačene su za sve uzorke i iznose između -1,3 (uzorak 1) i -1,5 (uzorak 3), što govori o dominaciji zelene boje. Vrijednosti parametra b^* za uzorke 2 i 3 su negativne i iznose -0,1 za uzorak 3 i -0,3 za uzorak 2, što je pokazatelj dominacije plave boje, uz zelenu. Međutim, vrijednosti parametra b^* za uzorke 1 i 4 pozitivnog su predznaka i iznose 0,5 za uzorak 4 i 0,6 za uzorak 1, što signalizira dominaciju žute boje, uz zelenu boju. Vrijednosti nijanse boje uzoraka dojenačke formule D kreću se od 155,0 (uzorak 1) do 194,0 (uzorak 2). Kromatičnost varira između 1,4 za uzorke 1, 2 i 4 te 1,5 za uzorak 3.



Slika 14. Vrijednosti L^* , a^* , b^* , h^* , C^* za dojenačku formulu E

U dojenačkoj formuli E detektirani su sivi tonovi svjetline uzorka (slika 14), odnosno, vrijednosti parametra L^* za dojenačku formulu E ujednačene su i poprimaju vrijednosti oko 50. Preciznije, vrijednost parametra L^* najniža je za uzorak 2 (55,8), a najviša za uzorak 1 (57,3). Nadalje, vrijednosti parametra a^* negativnog su predznaka za sva četiri mjerena uzorka. Parametar a^* najnižu vrijednost poprima u uzorku 1 (-1,3), a najveću u uzorku 3 (-1,2). Parametar b^* u svim uzorcima poprima vrijednosti pozitivnog predznaka, od čega je najniža za uzorak 2 (0,3), a najviša za uzorak 1 (0,7). Vrijednosti parametra h^* kreću se između 150,9 za uzorak 1 i 165,9 za uzorak 2. Uzorak 1 ima najveću kromatičnost koja iznosi 1,5, a najmanja kromatičnost izmjerena je kod uzorka 3 (1,3).

Parametar a^* pozitivne je vrijednosti u uzorcima svih dojenačkih formula.

Kod uzoraka dojenačkih formula A i D primijećena je nepravilnost u vrijednostima parametra b^* , koji je u uzoraka obaju formula za dio uzoraka pozitivan (dominacija žute boje), a za dio uzoraka

negativan (dominacija zelene boje), što može biti uzrokovano mjernom pogreškom ili pak nepravilnošću u sastavu navedenih formula.

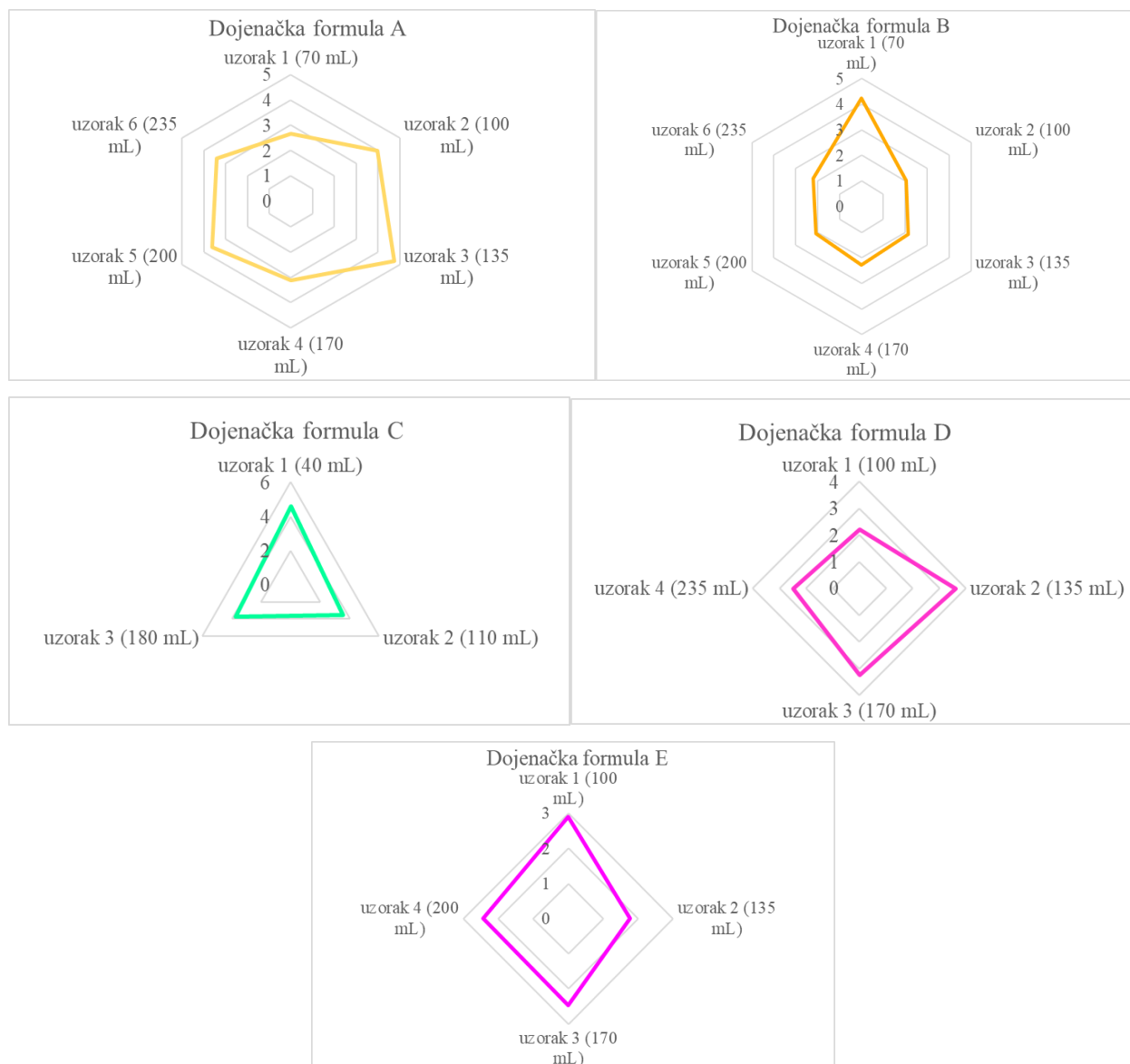
Parametar L^* u svim ispitivanim dojenačkim formulama poprima vrijednosti u rasponu od 138,2 do 209,0. U vrijednostima parametra L^* (svjetline) nije uočena pravilnost promjene ovisno o dobi djeteta kojoj je namijenjeno pojedino razrjeđenje uzorka.

S obzirom na to, da je kolorimetrijskom analizom o dobi djeteta ovisnih razrjeđenja dojenačkih formula B, C i E utvrđeno da uzorak svake pojedine dojenačke formule s najmanjom vrijednošću parametra h^* (nijansa) ima najveću vrijednost parametra C^* (kromatičnost), i obratno, uzorak s najvećom vrijednošću parametra h^* ima najmanju vrijednost parametra C^* , jasno je vidljiva obrnuto – proporcionalna povezanost navedenih parametara.

Zbog malih odstupanja u rezultatima, ovu povezanost nije moguće primijetiti kod uzorka 3 dojenačke formule A te kod uzorka 3 dojenačke formule D, jer navedeni uzorci imaju najveću vrijednost parametra h^* , u usporedbi s ostalim uzorcima, ali nemaju najmanju vrijednost parametra C^* .

4.3.2. Promjena boje dojenačkih formula u odnosu na mlijeko u prahu

Izračunom ΔE vrijednosti, na način koji je opisan u poglavlju 3.2.3. Mjerenje boje, dobiveni su radar-dijagrami prikazani na slici 15, koji prikazuju razliku u boji uzoraka dojenačkih formula A – E u odnosu na boju mlijeka u prahu.



Slika 15. Odstupanja boje pojedine dojenačke formule od boje mlijeka u prahu, prikazano pomoću delta E vrijednosti

Percepcija boje je, prema Mokrzycki i Tatol (2011), jedna od osnovnih percepcija u ljudi te postoji potreba za razlikovanjem boje, detektiranjem sličnosti ili razlika među uzorcima. Kako bi se boje uzoraka mogle identificirati kao slične, identične ili različite, koristi se parametar ΔE .

Kod dojenačke formule E izračunata je najmanja vrijednost ΔE , koja iznosi između 1,77 i 2,89, što, prema Schlöpfer (1993) i Strgar-Kurečić (2023), znači da se razlika boje vidi.

Vrijednost ΔE za dojenačke formule A ($\Delta E = 2,7 - 4,8$), B ($\Delta E = 2,0 - 4,2$) i D ($\Delta E = 2,2 - 3,6$) poprima vrijednosti koje navedene dojenačke formule svrstavaju u dvije kategorije – razlika boja se vidi ($\Delta E = 1 - 3$) i razlika boja se dobro vidi ($\Delta E = 3 - 6$).

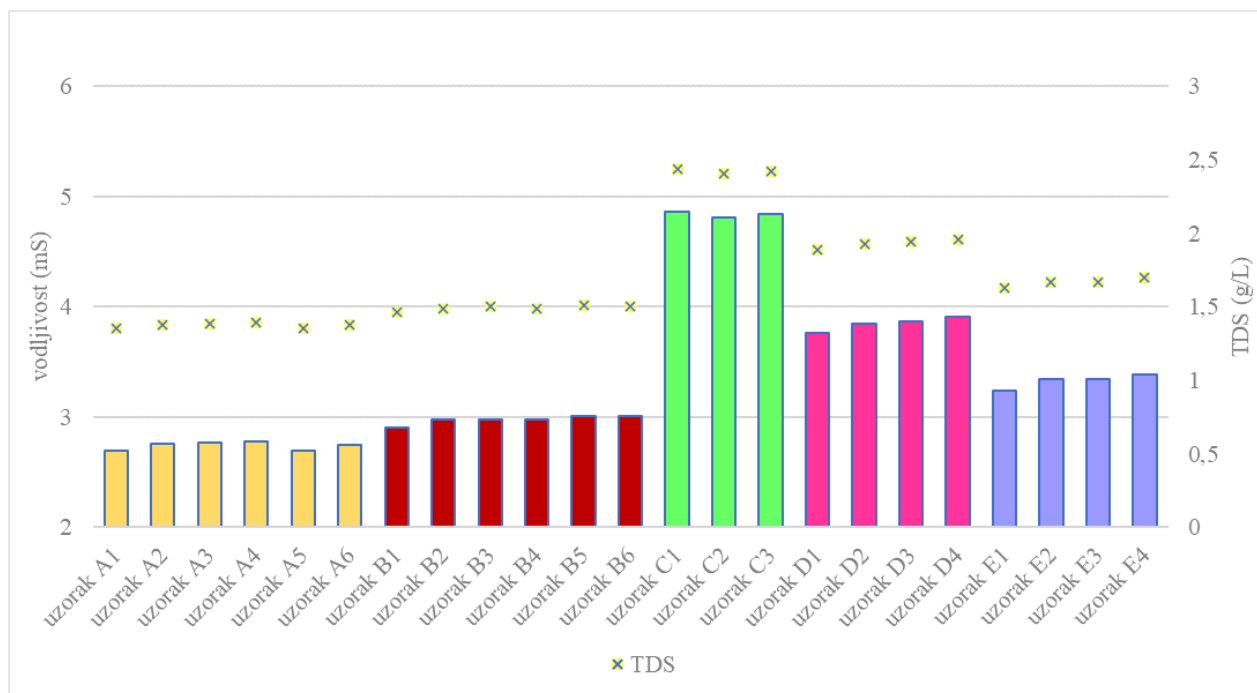
Uzorci dojenačke formule C bilježe najveće odstupanje, u usporedbi s uzorcima ostalih dojenačkih formula te njihove ΔE vrijednosti iznose između 2,6 i 4,6, što znači da se razlika u boji dobro vidi.

Ipak, analizom i usporedbom ΔE vrijednosti uzoraka dojenačkih formula A – E, ustanovljeno je da uzorci nijedne dojenačke formule nemaju očigledno odstupanje ($\Delta E > 6$), u odnosu na boju mlijeka u prahu

4.4. VODLJIVOST UZORAKA DOJENAČKIH FORMULA

Mjerenje električne vodljivosti našlo je široku primjenu u prehrambenoj industriji. Vodljivost mlijeka i mliječnih proizvoda predmet je istraživanja znanstvenika već više od 40 godina te pomaže u određivanju sastava masti, vode i proteina (Mabrook i Petty, 2003).

Mlijeko sadrži visoke koncentracije ukupnih otopljenih tvari (TDS), bilo da su one organskog ili anorganskog porijekla (PerkinElmer, Inc., 2017). Stupičasti dijagram (slika 16) prikazuje dobivene rezultate vodljivosti i prisutnosti ukupnih otopljenih tvari u svim uzorcima dojenačkih formula A do E.



Slika 16. Vodljivost i ukupne otopljene tvari (TDS) za svaki pojedini uzorak dojenačkih formula

Najveću vodljivost (prosječno 4,8 mS) imaju uzorci dojenačke formule C (stupići zelene boje).. Isti uzorci imaju i najviše ukupnih otopljenih tvari, odnosno najveću TDS vrijednost, koja prosječno za prikazana tri uzorka iznosi 2,4 g/L. Vodljivost je najmanja u uzorcima dojenačke formule A (stupići žute boje), gdje za šest prikazanih uzoraka prosječno iznosi 2,7 mS. Navedeni uzorci ujedno imaju i najmanju količinu otopljenih tvari pa TDS u ovom slučaju iznosi prosječno 1,4 g/L.

Primijećena je proporcionalna povezanost vodljivosti uzoraka i količine u njima otopljenih tvari. Dojenačka formula C ima najveću vodljivost (prosječno 4,8 mS) te ujedno najveću TDS vrijednost (prosječno 2,4 g/L). Zatim slijedi dojenačka formula D s prosječnom vodljivošću od 3,9 mS i prosječnom TDS vrijednošću od 1,9 g/L. Nadalje, dojenačka formula E treća je po redu po visini vrijednosti vodljivosti (prosječno 3,3 mS) i po količini ukupnih otopljenih tvari, koja u uzorcima ove formule iznosi prosječno 1,7 g/L. Predzadnja po redu dojenačka formula po vrijednosti vodljivosti je dojenačka formula B (prosječna vodljivost u uzorcima iznosi 3,0 mS), a TDS uzoraka ove formule ima prosječnu vrijednost od 1,5 g/L. Naposljetku, formula s najmanjom vrijednošću vodljivosti (2,7 mS) i najmanjim TDS-om (1,4 g/L) je dojenačka formula A.

Dakle, iz rezultata dobivenih analizom različitih uzoraka različitih dojenačkih formula primjetno je da povećanje vodljivosti određenog uzorka prati i povećanje TDS vrijednosti.

Usporedbom navedenih vrijednosti vodljivosti i TDS vrijednosti za svaku pojedinu formulu te stavljanjem tih vrijednosti u omjer, može se primijetiti da je količina otopljenih tvari u pojedinom uzorku jednaka otprilike polovici (50 %) vodljivosti. Odnosno, kod uzoraka dojenačkih formula B i C vrijednost TDS iznosi 50 % vodljivosti, kod uzoraka dojenačke formule D vrijednost ukupnih otopljenih tvari iznosi 48,7 % vodljivosti istih uzoraka, dok kod uzoraka dojenačkih formula A i E TDS vrijednost iznosi više od 51 % vodljivosti, i to 51,5 % kod uzoraka dojenačke formule E i 51,9 % kod uzoraka dojenačke formule A.

Navedeni omjeri su u skladu s teorijskom definicijom, koja govori da je TDS jakih ionskih otopina jednak polovini vodljivosti, odnosno, faktor konverzije TDS-a u vodljivost za jake ionske otopine iznosi 0,5, a za slabe 0,7 (Hanna Instruments USA Knowledge Base, 2023). Računa se prema formuli $TDS = faktor \times EC$, pri čemu je faktor 0,5 ili 0,7, a EC je električna vodljivost mjerena pri 25 °C.

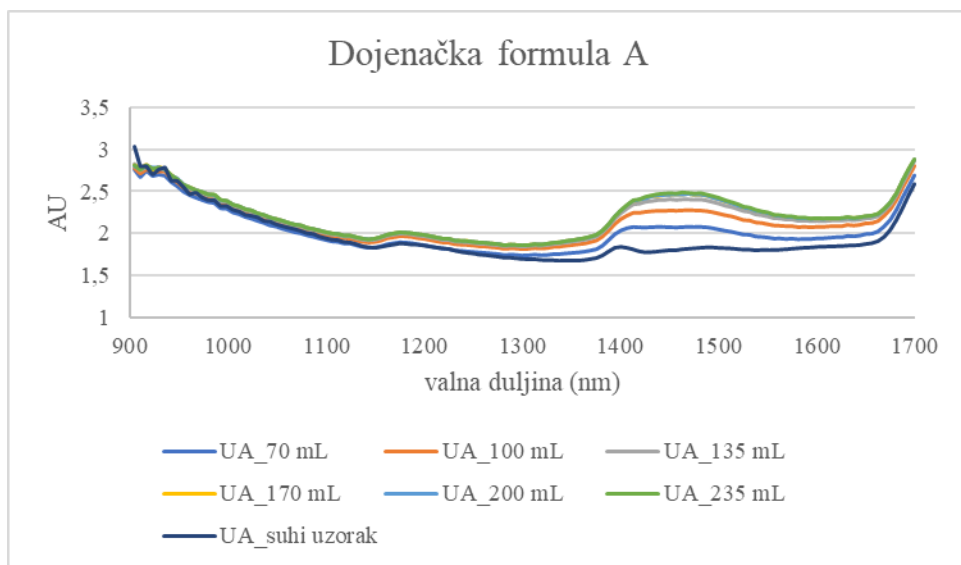
Prema Mabrook i Petty (2023), na vodljivost mlijeka utječu razlike u sastavu mlijeka različitih uzoraka, u ovom slučaju različitih formula, što je vidljivo iz rezultata prikazanih na slici 15. Najveća vodljivost detektirana je kod dojenačke formule C, koja je na bazi aminokiselina. Slijedi ju dojenačka formula D, na bazi proteinskih hidrolizata. Potom slijedi dojenačka formula E, na bazi kozjeg mlijeka. Najmanja vodljivost detektirana je kod dojenačkih formula A i B, na bazi proteina sirutke.

4.5. ANALIZA REZULTATA NIR SPEKTROSKOPIJE

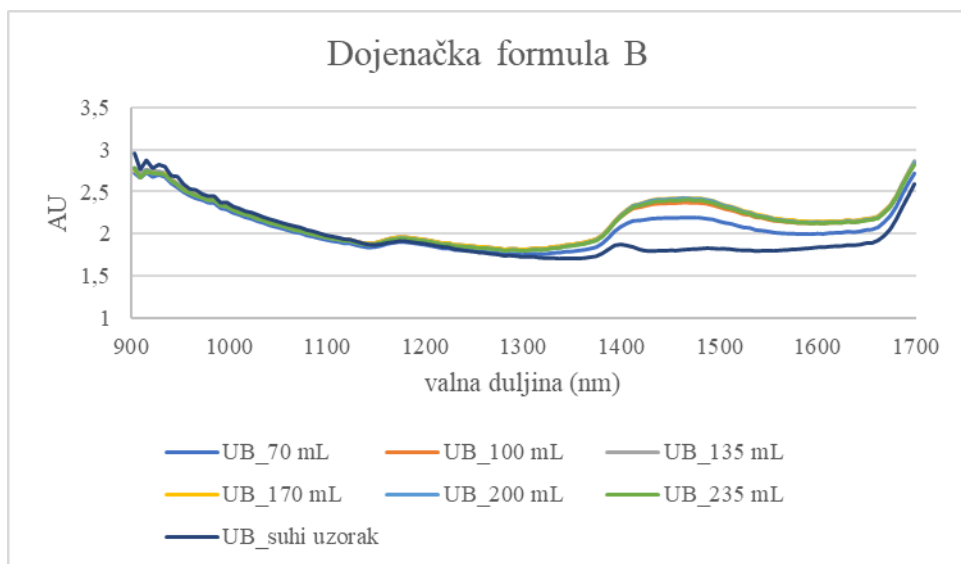
4.5.1. NIR spektri dojenačkih formula snimljeni laboratorijskim uređajem

Kako bi se ustanovile potencijalne razlike i sličnosti uzoraka na molekularnoj razini, pomoću laboratorijskog NIR spektroskopa mjerena je apsorbancija svih uzoraka svake pojedine dojenačke formule, uključujući i suhi uzorak (prah). Laboratorijski NIR spektroskop ima raspon valnih duljina od 904 do 1699 nm.

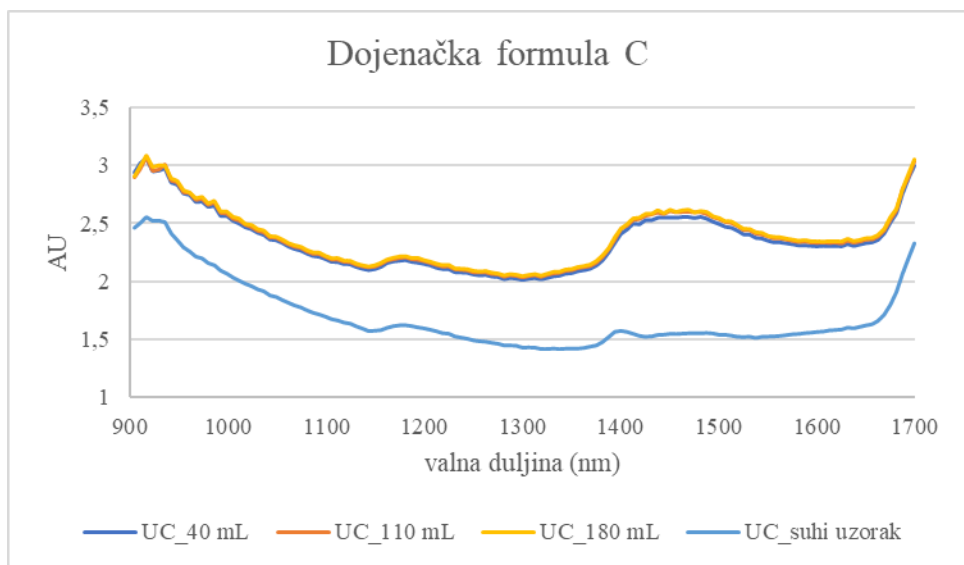
Slikama 17 – 21 prikazane su sličnosti i razlike spektara različitih volumena dojenačkih formula i suhog uzorka te u slici 22- mlijeko u prahu i voda korištena u pripremi uzoraka.



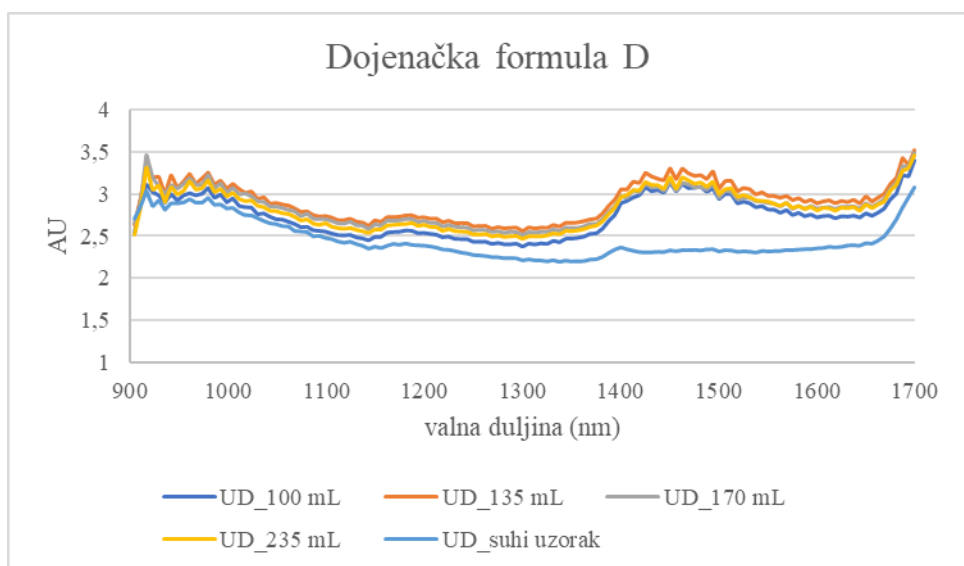
Slika 17. NIR spektri dojenačke formule A snimljeni laboratorijskim uređajem



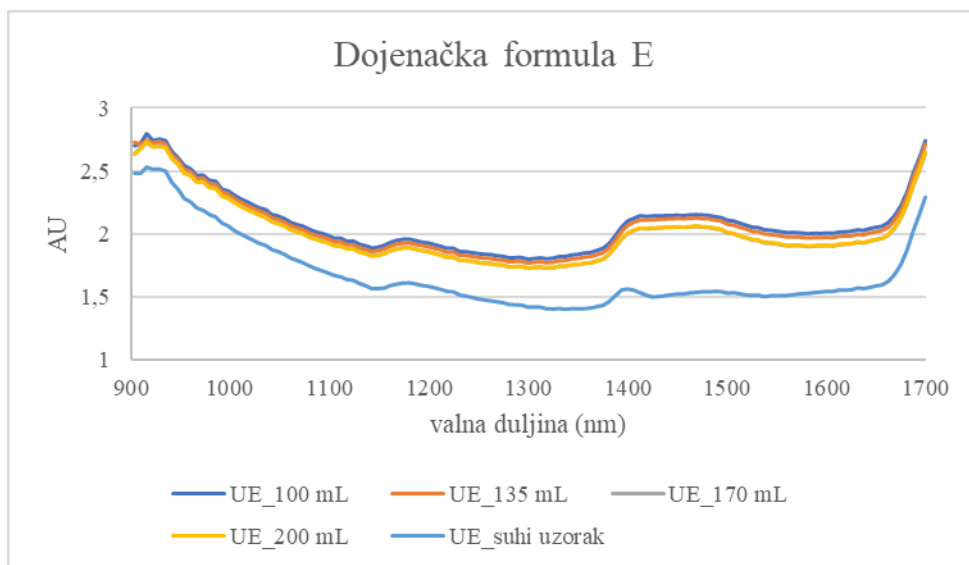
Slika 18. NIR spektri dojenačke formule B snimljeni laboratorijskim uređajem



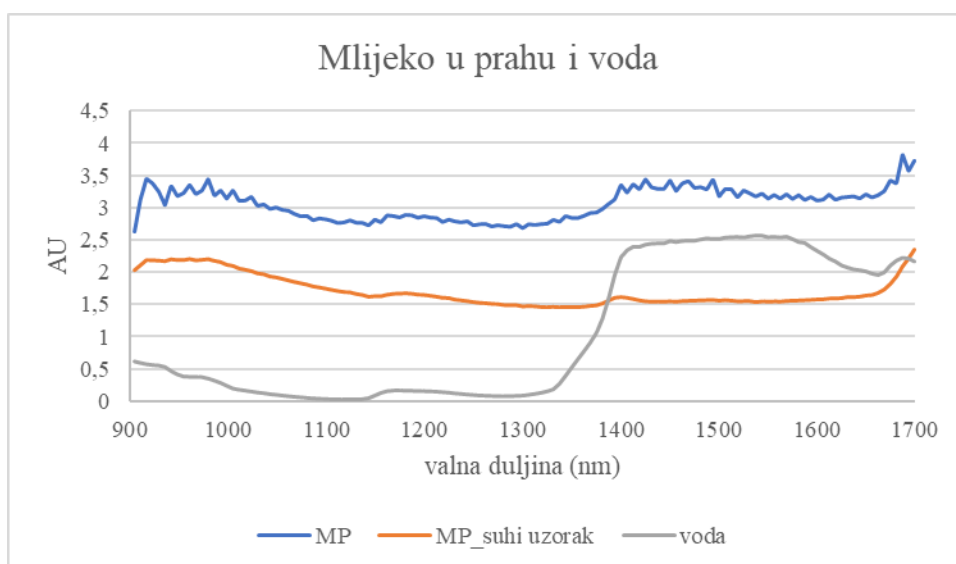
Slika 19. NIR spektri dojenačke formule C snimljeni laboratorijskim uređajem



Slika 20. NIR spektri dojenačke formule D snimljeni laboratorijskim uređajem



Slika 21. NIR spektri dojenačke formule E snimljeni laboratorijskim uređajem



Slika 22. NIR spektri mlijeka u prahu snimljeni laboratorijskim uređajem

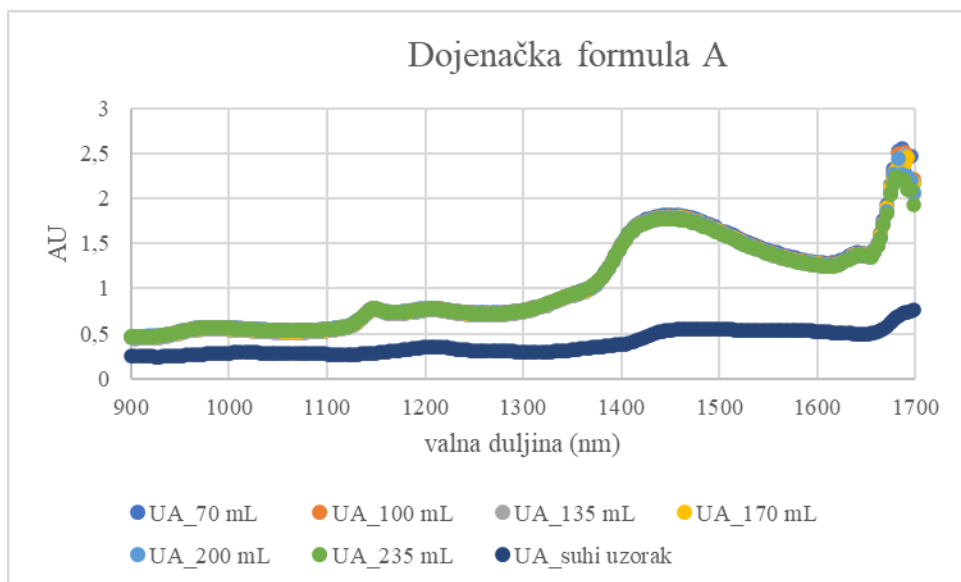
Na slikama 17 – 21 vidljivo je da je trend krivulja sličan za sve formule. Kod svake dojenačke formule primjetno je da krivulje pojedinačnih uzoraka prilično ujednačeno prate jedna drugu, a prati ih i trend suhog uzorka. Valja napomenuti kako se krivulja suhog uzorka uslijed nedostatka vode na svakom dijagramu nalazi ispod krivulja razrijeđenih uzoraka.

Kod svih razrijeđenih uzoraka dojenačkih formula vidljiv je *peak* pri otprilike 950 – 1000 nm valne duljine, što, prema podacima očitanim s apsorpcijske vrpce iz priloga 2, odgovara NH vezama, tj. detekciji proteina u uzorcima. Isto tako, vidljiv je *peak* pri otprilike 1200 nm, što, prema apsorpcijskoj vrpci (prilog 2), odgovara CH vezi, odnosno, pri 1200 nm detektirani su ugljikohidrati. Zatim, *peak* pri otprilike 1420 nm odgovara OH – skupini, tj. hidroksilnoj skupini, što prema apsorpcijskoj vrpci (prilog 2) znači prisutnost vode. Nadalje, krivulje svih uzoraka na slikama 16– 21 pri valnoj duljini od 1690 nm bilježe porast, što odgovara valnoj duljini CH veze, odnosno znači prisutnost ugljikohidrata.

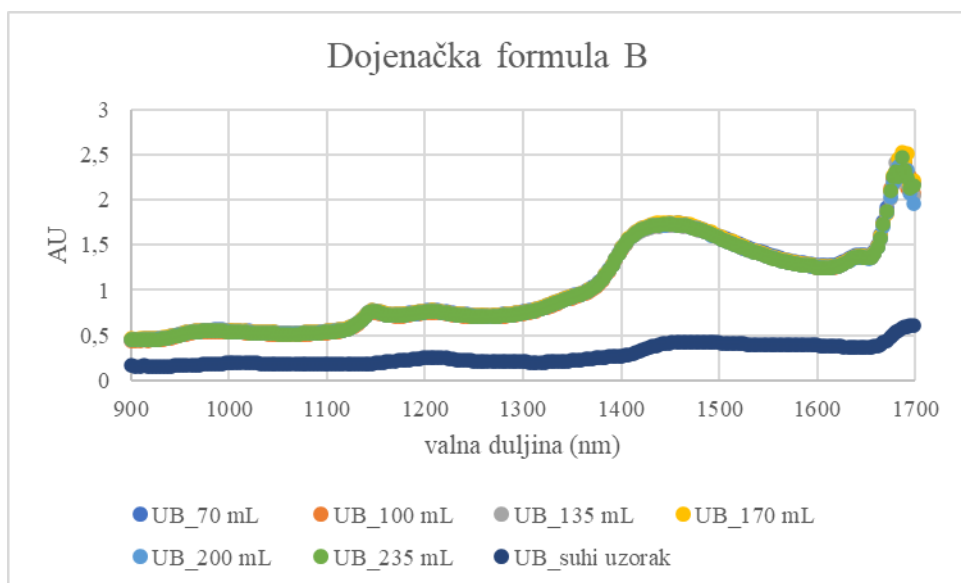
Kod suhog uzorka mlijeka u prahu, vidljiv je *peak* pri otprilike 1174 nm, koji odgovara CH vezi (prilog 2), a u skladu s tim, i porast krivulje pri valnoj duljini od 1690 nm odgovara CH vezi te znači prisutnost ugljikohidrata. Osim toga, detektira se *peak* pri otprilike 1420 nm, što odgovara OH – vezama iz vode, jer, iako suh, i ovaj uzorak ipak sadrži vodu, te se takav rezultat slaže s prikazom NIR krivulje mlijeka u prahu iz priloga 2.

4.5.2. NIR spektri dojenačkih formula snimljeni prijenosnim uređajem

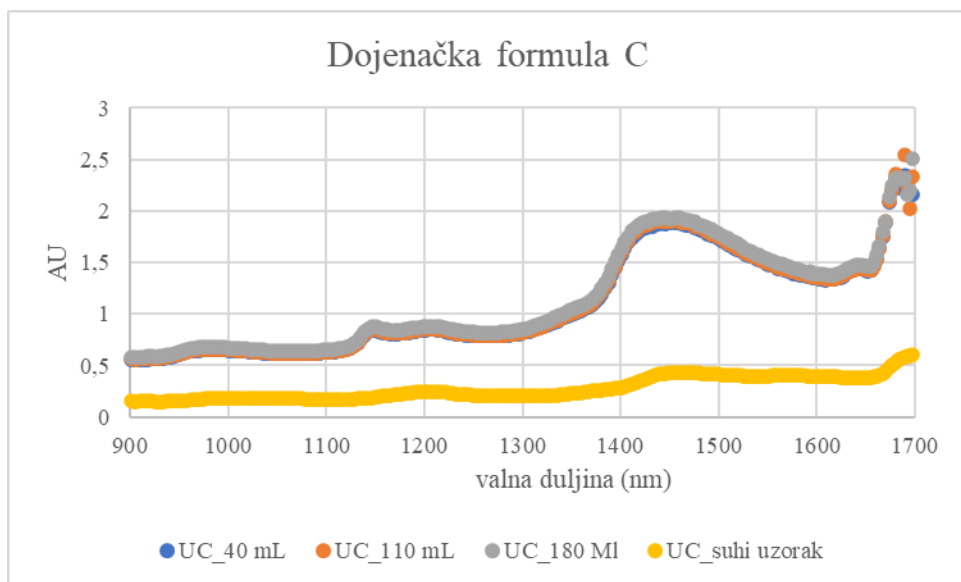
Primjena prijenosnog NIR uređaja sve je češća u prehrambenoj industriji i analizi kvalitete hrane (Beć i sur., 2022). Takav uređaj raspona valnih duljina 900 – 1700 nm korišten je za snimanje svih uzoraka dojenačkih formula A – E.



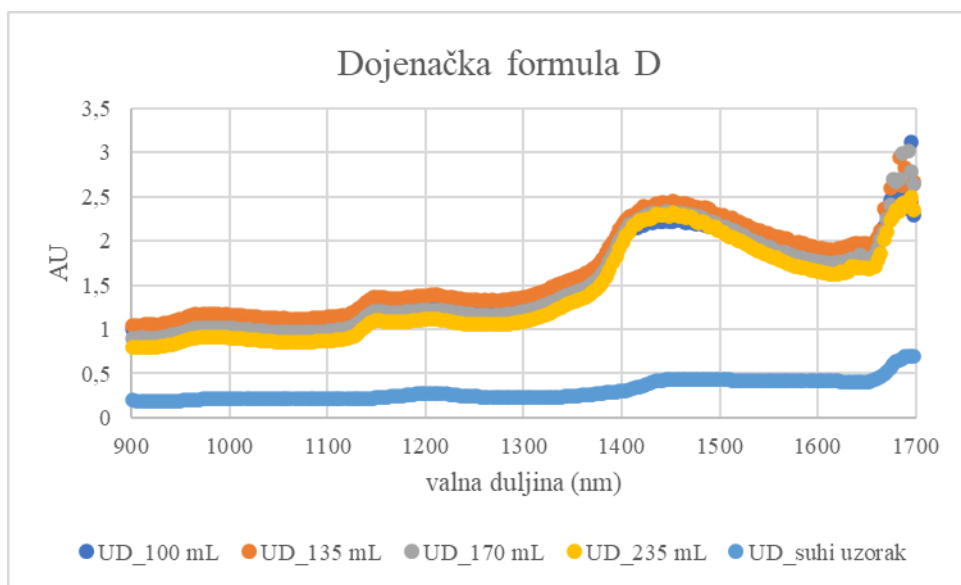
Slika 23. NIR spektri dojenačke formule A snimljeni prijenosnim uređajem



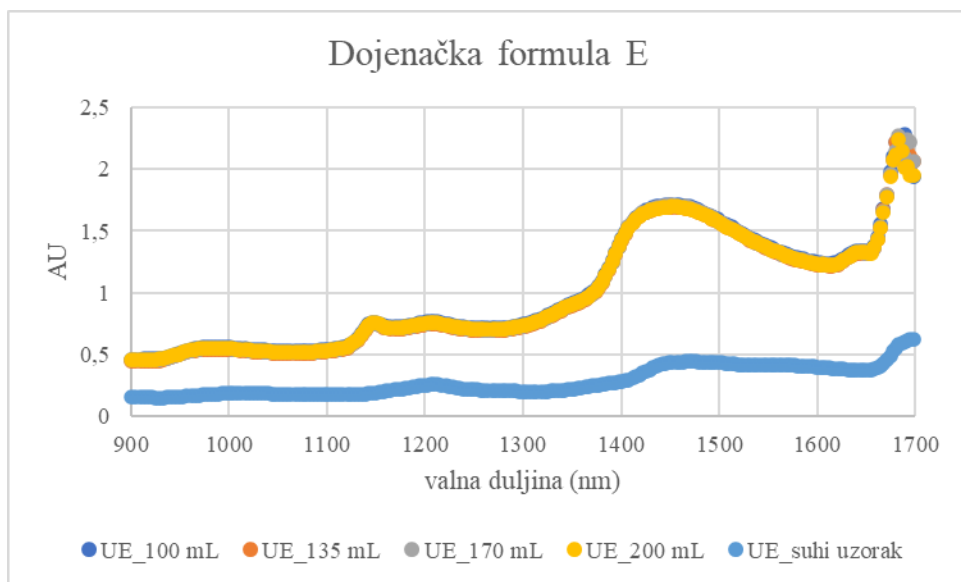
Slika 24. NIR spektri dojenačke formule B snimljeni prijenosnim uređajem



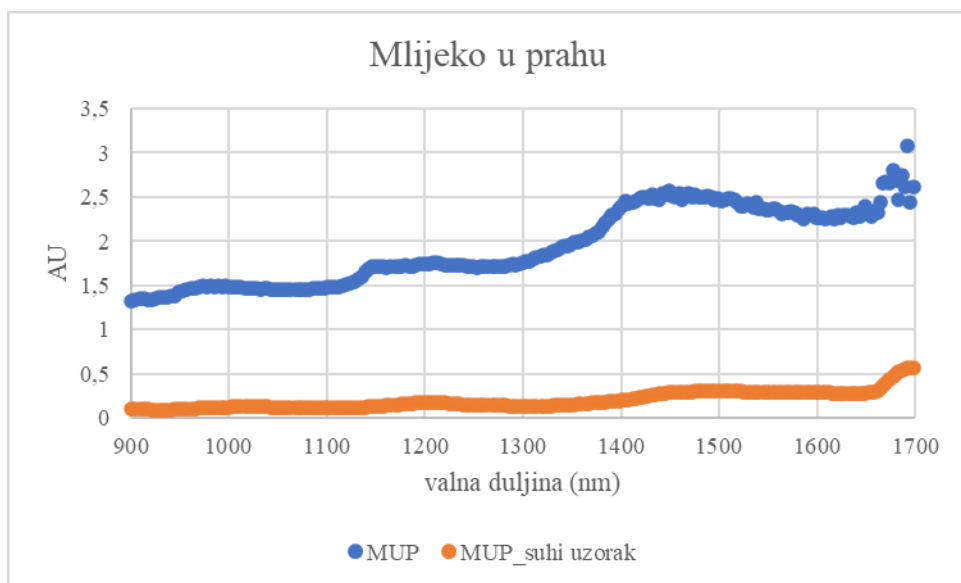
Slika 25. NIR spektri dojenačke formule C snimljeni prijenosnim uređajem



Slika 26. NIR spektri dojenačke formule D snimljeni prijenosnim uređajem



Slika 27. NIR spektri dojenačke formule E snimljeni prijenosnim uređajem



Slika 28. NIR spektri mlijeka u prahu snimljeni prijenosnim uređajem

Na slikama 23 – 28 vidljivo je da je i nakon analize prijenosnim NIR-om, trend krivulja sličan za sve formule, baš kao što je to slučaj kod analize laboratorijskim NIR-om. Kod svake dojenačke formule primjetno je da krivulje pojedinačnih uzoraka prilično ujednačeno prate jedna drugu, a

prati ih i trend suhog uzorka. Ponovno valja napomenuti kako se krivulja suhog uzorka uslijed nedostatka vode na svakom dijagramu nalazi ispod krivulja razrijeđenih uzoraka.

Kod svih razrijeđenih uzoraka dojenačkih formula vidljiv je *peak* pri otprilike 950 – 1000 nm valne duljine, što, prema apsorpcijskoj vrpci iz priloga 2, odgovara NH vezama, odnosno u uzorcima se detektiraju proteini. Osim toga, vidljiv je *peak* pri otprilike 1500 nm, što, prema apsorpcijskoj vrpci (prilog 2), odgovara CH vezi, odnosno, pri 1500 nm detektirani su ugljikohidrati. Zatim, *peak* pri otprilike 1420 nm odgovara OH – skupini, tj. hidroksilnoj skupini, što prema apsorpcijskoj vrpci (prilog 2) znači prisutnost vode. Nadalje, krivulje svih uzoraka na slikama 22 – 27 pri valnoj duljini od 1690 nm imaju uzlazno kretanje, što odgovara valnoj duljini CH veze, odnosno znači prisutnost ugljikohidrata (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017).

Kod suhog uzorka mlijeka u prahu vidljiv je *peak* pri 1174 nm, koji odgovara CH vezi (prilog 2), a u skladu s tim, i porast krivulje pri valnoj duljini od 1690 nm što prema prethodno spomenutom odgovara CH vezi te znači prisutnost ugljikohidrata (Beć i sur., 2022). Nadalje, detektira se *peak* pri otprilike 1420 nm, što odgovara OH – vezama iz vode, jer, iako suh, i ovaj uzorak ipak sadrži vodu, te se takav rezultat slaže s prikazom NIR krivulje mlijeka u prahu iz priloga 2 te s krivuljom dobivenom analizom laboratorijskim NIR uređajem.

Krivulje apsorpcije pri valnim duljinama NIR spektrometra (900 – 1699) podjednake su trenda za sve uzorke pojedinačne dojenačke formule, a trendovi krivulja dobiveni analizom laboratorijskim NIR-om i onih dobivenih analizom uzoraka prijenosnim NIR-om ujednačeni su i međusobno se prate, kao i trendovi krivulja suhih uzoraka za sve formule i za mlijeko u prahu.

Trendovi krivulja su u skladu s literaturnim podacima kada su uz pomoć NIR-a snimani uzorci kozjeg mlijeka koje se nudi kao alternativa djeci koja imaju alergije (Zhao i sur., 2022), ali i dječjih formula koje su Liu i sur. (2021) ispitivali u originalnoj i patvorenoj formi.

4.6. KEMOMETRIJA

Pojam kemometrija podrazumijeva kemijsku disciplinu, koja, koristeći matematičke i statističke metode, osigurava maksimalan broj podataka o kemijskom sastavu hrane, do čega dolazi analizom kemijskih podataka. Posljednjih godina kemometrija je pronašla svoju primjenu u analizi hrane, jer olakšava istraživanje i interpretaciju kemijskih i bioloških informacija te pomaže identificirati

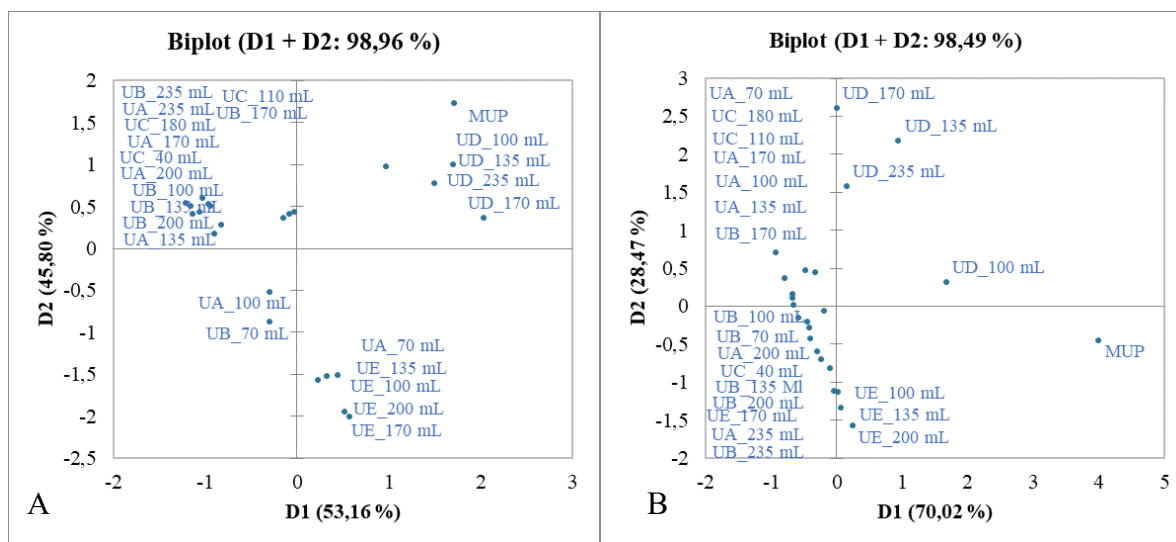
kemijske, biokemijske i biološke markere u području sigurnosti i kvalitete hrane (Andre i Soukoulis, 2020). Dok NIR pruža apsorpcijske spektre koji nisu potpuno precizni, s obzirom na to da nerijetko dolazi do preklapanja (eng. *overlapping*) apsorpcijskih vrpca, kemometrija se postavlja kao metoda koja omogućuje preciznu diferencijaciju uzoraka, jer detektira i najmanje varijacije podataka u spektru, prikuplja ih i zatim primjenjuje kao diskriminante. Stoga se kemometrija, kao nadopuna NIR-u, sve češće koristi upravo u istraživanjima vezanim za prehrambenu industriju i hranu (Folli i sur., 2022).

Postoji nekoliko statističkih metoda koje se koriste u kemometrijskim analizama, a to su: analiza glavnih komponenata (engl. *Principal Component Analysis*, *PCA*), kanonička korelacijska analiza (engl. *Canonical Correlation Analysis*, *CCA*), analiza zajedničkih komponenata i određene težine (engl. *Common Components and Specific Weight Analysis*, *CCSWA*), faktorska diskriminativna analiza (eng. *Factorial Discriminant Analysis*, *FDA*), regresija glavnih komponenata (engl. *Principal Component Regression*, *PCR*) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Squares*, *PLS*) (Matijević i Blažić, 2008). Statističke metode korištene za analizu podataka istraživanja u ovom radu su analiza glavnih komponenata (PCA) i regresija glavnih komponenata (PCR).

4.6.1. Analiza glavnih komponenata

Analiza glavnih komponenata (PCA) svoju primjenu pronalazi pretežno u obradi podataka s više varijabli. Primarni cilj PCA analize je analizirati povezanost (korelaciju) unutar jednog skupa podataka i tako reducirati dimenzionalnost prostora, odnosno, pomoću što manjeg broja varijabli objasniti što veći broj varijabli. Zbog toga što analizira korelaciju varijabli, PCA analizu nije moguće primijeniti u slučajevima kada korelacije nema. PCA analiza omogućava pojednostavljivanje signala i pripremu za obradu (Matijević i Blažić, 2008). Ovaj način analize omogućava kvalitativno razlikovanje uzoraka koji su obuhvaćeni analizom te se njihovo grupiranje temelji na sličnostima, a različitosti onda ukazuju na neku specifičnu različitost, a to je koncentracija ili namjerno dodan kontaminant, kao što je bio slučaj u radu Liu i suradnika (2021) kada su dojenačkim formulama dodane različite koncentracije hidroliziranog proteina sirutke i melamina. Analiza glavnih komponenata provedena je (i) na NIR uzorcima laboratorijskog i

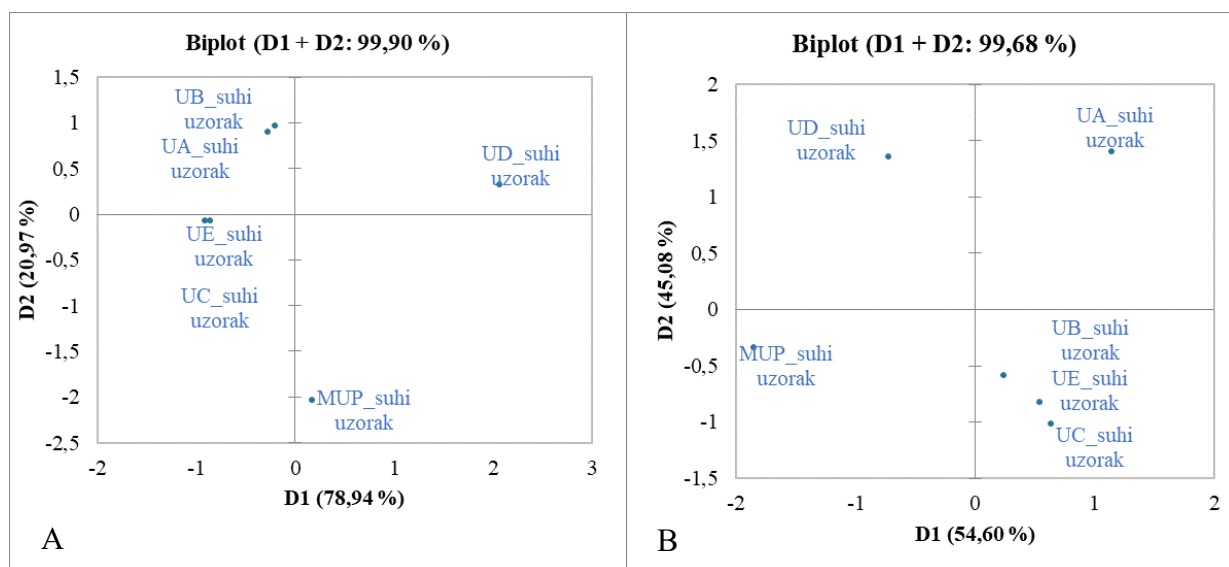
prijenosnog uređaja za tekuće (slika 29) i praškaste uzorke (slika 30), (ii) na osnovu kemijskog sastava (slika 31) te (iii) vodljivosti i TDS za tekuće uzorke (slika 32).



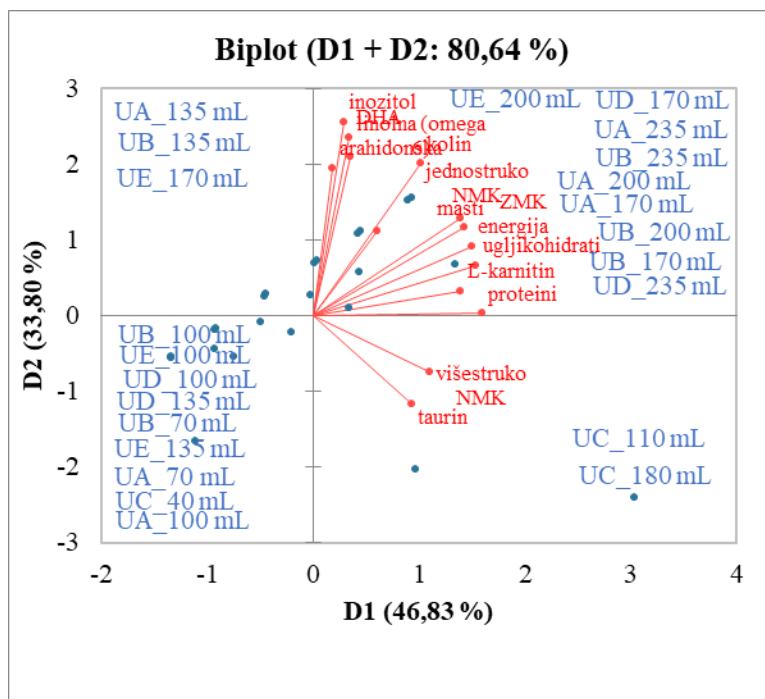
Slika 29. Analiza glavnih komponenta provedena na prosječnim NIR spektrima tekućih uzoraka, snimljenih laboratorijskim (A) i prijenosnim (B) NIR uređajem

Na osnovu NIR spektara, unutar biplota PCA analize, dojenačka formula D i mlijeko u prahu grupiraju se unutar prvog kvadranta, dok se dojenačke formule A, B i C grupiraju u drugom kvadrantu, s iznimkom uzorka dojenačke formule A volumena 100 mL i uzorka dojenačke formule B volumena 70 mL, koji su se grupirali u trećem kvadrantu. Pretpostavka je da ti uzorci nisu dovoljno homogeni u odnosu na formula istih uzoraka u većem volumenu, jer upravo takvo ispreplitanje uzoraka uslijed neravnomjerne homegeniziranosti uzoraka u analizi kvalitete grožđa su potvrdili Boido i sur. (2013). Uzorak dojenačke formule A volumena 70 mL grupirao se u četvrtom kvadrantu, zajedno sa svim uzorcima dojenačke formule E. Kako navedena analiza opisuje 98,96% svih varijacija u promatranom skupu podataka, jasno je kako je kvalitativno dojenačka formula D vrlo slična mlijeku u prahu, imajući u vidu molekularne vibracije u NIR području od 900-1699 nm. Spektri snimljeni prijenosnim uređajem (slika 29B) pokazuju kako su se u prvom kvadrantu grupirali uzorci dojenačke formule D, a u četvrtom kvadrantu uzorci dojenačke formule E, što odgovara biplotu dobivenom analizom NIR spektara snimljenih pomoću laboratorijskog NIR-a. Iznimka je uzorak dojenačke formule E od 170 mL, koji se smjestio u trećem kvadrantu. Uzorci dojenačkih formula A, B i C grupirali su se u drugom i trećem kvadrantu.

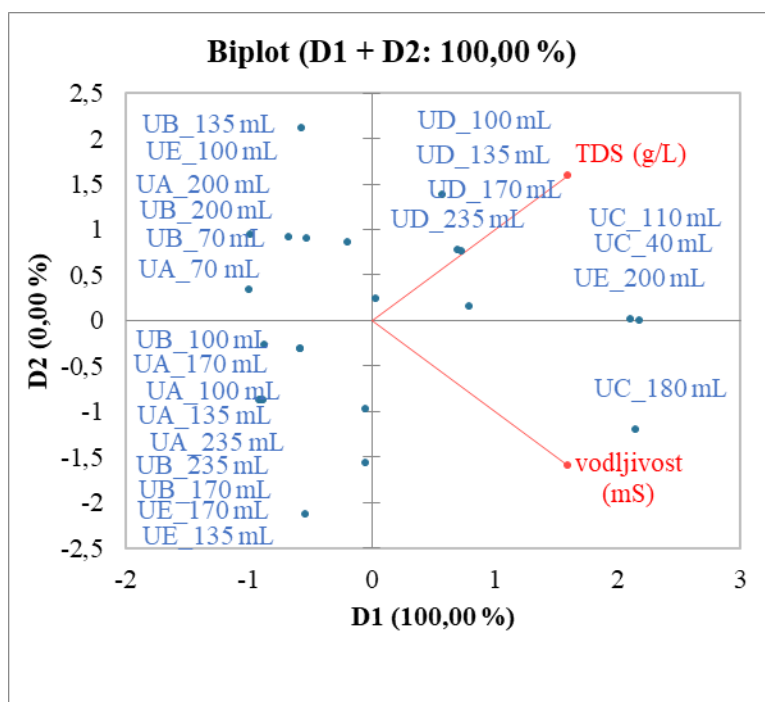
Suhi uzorak dojenačke formule A nalazi se u prvom kvadrantu (slika 30B), a od njega je potpuno različit suhi uzorak mlijeka u prahu, koje se nalazi u trećem kvadrantu. Suhi uzorak dojenačke formule D nalazi se u drugom kvadrantu, dok su suhi uzorci dojenačkih formula B, C i E grupirani u četvrtom kvadrantu. Suhi uzorak dojenačke formule D nalazi se u prvom kvadrantu (slika 30B). U drugom su kvadrantu suhi uzorci dojenačkih formula A i B, a potpuno suprotno njima, u četvrtom kvadrantu, nalazi se suhi uzorak mlijeka u prahu. U trećem su kvadrantu grupirani suhi uzorci dojenačkih formula C i E.



Slika 30. Analiza glavnih komponentata provedena na prosječnim NIR spektrima praškastih uzoraka, snimljenih laboratorijskim (A) i prijenosnim (B) NIR uređajem



Slika 31. Analiza glavnih komponenata i raspodjela uzoraka prema sadržaju energije i nutrijenata tekućih uzoraka



Slika 32. Analiza glavnih komponenata i raspodjela uzoraka prema otopljenoj suhoj tvari i vodljivosti

Sljedeći korak bio je prema Liu i sur. (2021) utvrditi na osnovu kojih kemijskih komponenti se uzori grupiraju te su kao sekundarne varijable NIR spektrima pridodane kvantitativne varijable kemijskog sastava (slika 31). Višestruke masne kiseline i taurin su dominantne u uzorku C te su svi grupirani u četvrtom kvadrantu. Obzirom da su snimani NIR spektri za svaku od koncentracija određene dojenačke formule, u trećem kvadrantu su se grupirali pripravci najmanjih volumena (npr. UC_40 mL, UA_70 mL, i sl.), što je logično, jer je za pripravu većih volumena svake dojenačke formule korišteno i proporcionalno više mase samog praha.

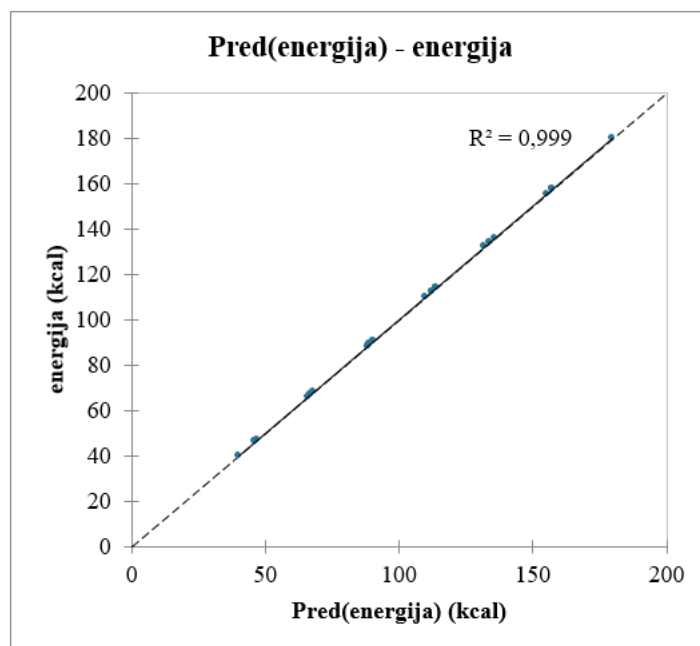
Kada su NIR spektrima pridružene vrijednosti vodljivosti i TDS-a (slika 32), grupirali su se manji do srednji volumeni dojenačkih formula A, B i E, te su one očekivano imale i niže vrijednosti ukupno otopljenih krutih tvari (TDS).

Slike 29-32 prikazuju rezultate dobivene PCA analizom, a ona opisuje između 80 i 100 % svih varijacija u promatranom skupu podataka.

4.6.2. Regresija glavnih komponenata

Problem višestruke regresije je u tome što korelacija između većeg broja varijabli može dovesti do matematičkih problema i nerealne procjene zavisne varijable. Metoda regresije glavnih komponenata stoga ima mogućnost uzeti u obzir većinu varijacija između glavnih komponenata i predvidjeti zavisnu varijablu (Matijević i Blažić, 2008).

Koliko je neki model reprezentativan, može se ocijeniti koeficijentom determinacije (R^2). Što je vrijednosti koeficijenta determinacije bliža jedinici, to je korišteni model reprezentativniji (gajdoš i sur., 2017).



Slika 33. Predviđanje (Pred) energetskeg sadržaja u uzorcima dojenačkih formula pomoću metode regresije glavnih komponenata, $R^2 = 0,999$

Model za predviđanje energetske vrijednosti u uzorcima dojenačkih formula pokazuje koeficijent determinacije približno jednak jedinici ($R^2 = 0,999$), što znači da je korišteni model gotovo potpuno reprezentativan (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017).

Iako su uobičajeni linearni regresijski modeli (Gajdoš Kljusurić i sur., 2017; Zhao i sur., 2022), često se koriste i PCR modeli (Hanousek Čiča i sur., 2019) te neuronske mreže (Liu i sur., 2021).

U ovom radu primijenjena je metoda regresije glavnih komponenata tj. PCR metoda jer kod nje nije potrebno predprocesiranje spektara.

Primjer predviđanja energije dojenačke formule (slika 33) pokazuje iznimno dobro slaganje eksperimentalnih podataka i onih koje su predviđene modelom, što ukazuje na potencijal u kvantitativnom smislu, tj. da se snime NIR spektri, na osnovu kojih se pomoću razvijenog modela za energiju može predvidjeti očekivani sadržaj. Navedena metoda korištena je i za predviđanje makronutritivnog i mikronutritivnog sadržaja te vodljivosti i količine otopljenih tvari, a dobiveni modeli nalaze se u prilogima (prilog 6 – prilog 8). Međutim PCR modeli se temelje na prvih deset faktora (F1-F10) faktorske analize, što uzrokuje gubitak potencijalno ključnih informacija u NIR

spektru, te u slučajevima kada se cilja traženje otiska određenog spoja i sl. PCR metoda se ne preporuča (Hanousek Čiča i sur., 2019).

Ovaj rad pokazao je potencijal primjene NIR spektroskopije u razlikovanju dojenačkih formula za posebne potrebe, što je opravdanje korištenja uređaja na kvalitativnoj razini. Međutim, modeliranje je pokazalo kako postoji i potencijal kvantitativnog predviđanja energije te nutrijenata. Obzirom da su u radu korištena dva uređaja, svakako je prijenosni uređaj opravdao svoje mjerne sposobnosti jer kvalitativne i kvantitativne analize govore tome u prilog

5. ZAKLJUČCI

Provedena je analiza pet različitih hipoalergenih dojenačkih formula, kojom su obuhvaćene mase mjerica priloženih u proizvodu, energetske sastav formula, kolorimetrijska analiza uzoraka, NIR spektroskopska te kemometrijska analiza uzoraka. Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave, izvode se sljedeći zaključci:

1. Makronutritivni sastav dojenačkih formula uglavnom je ujednačen (zastupljenost proteina u svim je dojenačkim formulama između 8,0 i 11,0 %; ugljikohidrati su u A, B, D i E dojenačkim formulama zastupljeni u rasponu od 42,0 % do 43,0 %, a masti između 48,0 % i 49,0 %), međutim, najveće se odstupanje u zastupljenosti ugljikohidrata i masti detektira kod dojenačke formule C, koja sadrži 47,0 % ugljikohidrata i 42,0 % masti.
2. Usporedbom FAO-vih preporuka za dnevni energetske unos dojenčadi u dobi od tri, šest, devet i dvanaest mjeseci s dnevnim energetske unosom koji se ostvaruje ispitivanim dojenačkim formulama, primijećena su neka značajna odstupanja, i to: formule A, B, D i E prosječno osiguravaju 11,5 % manji dnevni energetske unos za dječake od preporučenog.
3. ΔE vrijednost uzoraka dojenačke formule C najviše odstupa od vrijednosti mlijeka u prahu te iznosi između 2,6 i 4,6, što znači da se razlika u boji dobro vidi. Ipak, usporedbom ΔE vrijednosti uzoraka dojenačkih formula A – E, vidljivo je da uzorci niti jedne dojenačke formule ne pokazuju očigledno odstupanje ($\Delta E > 6$), u odnosu na boju mlijeka u prahu.
4. Uočava se proporcionalna povezanost vodljivosti uzoraka i količine u njima otopljenih tvari (TDS).
5. Iz NIR spektara, snimljenih laboratorijskim i prijenosnim uređajem, detektirani su *peakovi* koji odgovaraju valnim duljinama karakterističnim za vodu, ugljikohidrate i proteine.
6. Analiza glavnih komponenata (PCA) pokazala je uspješno kvalitativno razlikovanje snimanih uzoraka dojenačkih formula na osnovu NIR mjerenja sa dva različita uređaja.
7. Primjena PCR modela pokazuje mogućnost da se kvantitativno procijeni očekivani sadržaj promatranih parametara za dojenačke formule na osnovu NIR spektara, snimljenih laboratorijskim i prijenosnim uređajem.

6. LITERATURA

AB Vista (2018) A Guide to NIR: Understanding NIR Spectra <https://www.abvista.com/news/a-guide-to-nir-understanding-nir-spectra> Pristupljeno 21. lipnja 2023.

Altazan AD, Gilmore LA, Guo J, Rosenberg DM, Toupou D, Gowins A, Burton JH, Beyl RA, Chow CC, Hall KD, Redman LM (2019) Unintentional error in formula preparation and its simulated impact on infant weight and adiposity. *Pediatr obes* **14**(12), e12564. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12564>

Andre CM, Soukoulis C (2020) Food Quality Assessed by Chemometrics. *Foods* **9**, 897. <https://doi.org/10.3390/foods9070897>

Anzalone GC, Glover AG, Pearce JM (2013) Open-Source Colorimeter. *Sensors* **13**, 5338-5346. <https://doi.org/10.3390/s130405338>

Babycentre (2021) How much milk does my six-month-old baby need after starting solids? <https://www.babycentre.co.uk/x552734/how-much-milk-does-my-six-month-old-baby-need-after-starting-solids> Pristupljeno 14. lipnja 2023.

Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L (1999) Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 1191–1194. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70198-3](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70198-3)

Beć KB, Grabska J, Huck CW (2022) Miniaturized NIR Spectroscopy in Food Analysis and Quality Control: Promises, Challenges, and Perspectives. *Foods* **11**, 1465 <https://doi.org/10.3390/foods11101465>

Boido E, Farina L, Carrau F, Dellacassa E, Cozzollino D (2013) Characterization of Glycosylated Aroma Compounds in TannatGrapes and Feasibility of the Near Infrared SpectroscopyApplication for Their Prediction. *Food Anal Methods* **6**, 100–111. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9423-5>

Brooke-Taylor S, Dwyer K, Woodford K, Kost N (2017). Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. *Adv Nutr (Bethesda, Md.)*, **8**, 739–748. <https://doi.org/10.3945/an.116.013953>

Butte NF, Wong WW, Garza C (1989) Energy cost of growth during infancy. *The Proc Nutr Soc* **48**, 303–312. <https://doi.org/10.1079/pns19890042>

Chudy S, Bilska S, Kowalski R, Teichert J (2020) Colour of milk and milk products in CIE L*a*b* space. *Med Weter* **76**, 77-81. [dx.doi.org/10.21521/mw.6327](https://doi.org/10.21521/mw.6327)

Ćorić L (2023) Funkcionalna blisko-infracrvena (NIR) spektroskopija u senzorskoj ocjeni gorkih biljnih likera. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

D'Auria E, Salvatore S, Acunzo M, Peroni D, Pendergast E, Di Profio E, Fiore G, Zuccotti GV, Verduci E (2021) Hydrolysed Formulas in the Management of Cow's Milk Allergy: New Insights, Pitfalls and Tips. *Nutrients* **13**, 2762. <https://doi.org/10.3390/nu13082762>

de Mendonça Pereira BF, de Almeida CC, Leandro KC, da Costa MP, Conte-Junior CA, Spisso BF (2020) Occurrence, sources, and pathways of chemical contaminants in infant formulas. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 1378-1396. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12559>

Dupont C, Bocquet A, Tomé D, Bernard M, Campeotto F, Dumond P, Essex A, Frelut ML, Guénard-Bilbault L, Lack G, Linglart A, Payot F, Taieb A, Kalach N (2020) Hydrolyzed Rice Protein-Based Formulas, a Vegetal Alternative in Cow's Milk Allergy. *Nutrients* **12**, 2654. <https://doi.org/10.3390/nu12092654>

FAO (2004) Energy Requirements of Infants from Birth to 12 Months. FAO-Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/3/Y5686e/y5686e05.htm> Pristupljeno 7. lipnja 2023.

Flom JD, Sicherer SH (2019) Epidemiology of Cow's Milk Allergy. *Nutrients* **11**, 1051. <https://doi.org/10.3390/nu11051051>

Folli GS, Santos LP, Santos FD, Cunha FHP, Schaffel IF, Borghi FT, Barros IHAS, Pires AA, Ribeiro AVFN, Romão W, Filgueiras PR (2022) Food analysis by portable NIR spectrometer. *Food Chemistry Advances* **1**, 100074 <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100074>

Fung F, Wang HS, Menon S (2018) Food safety in the 21st century. *Biomed J* **41**, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>

Gajdoš Kljusurić J, Valinger D, Jurinjak Tušek A, Benković M, Jurina T (2017) Application of Near Infrared Spectroscopy (NIRs), PCA and PLS models for the analysis of dried medicinal plants. U: Science within Food: Up-to-date Advances on Research and Educational Ideas, (Méndez-Vilas, A., ured.) Formatex Research Center, Badajoz, str. 28-35.

Gribble K, Berry N, Kerac M, Challinor M (2017) Volume marker inaccuracies: A cross-sectional survey of infant feeding bottles. *Matern Child Nutr* **13**, e12388 <https://doi.org/10.1111/mcn.12388>

Hanna Instruments USA Knowledge Base (2023) What is the relationship between TDS and EC? <https://knowledge.hannainst.com/en/knowledge/ec-tds-what-is-the-relationship-between-tds-and-ec> Pristupljeno 18. lipnja 2023.

Hanousek Čiča, K., Rupert, M., Koczon, P., Derewiaka, D., Gajdoš Kljusurić, J., Petravić Tominac, V., Mrvčić, J., Stanzer, D. (2019) Characterisation of flavour compounds in Biska – a herbal spirit produced with mistletoe. *J Inst Brew* **125**, 143-154. <https://doi.org/10.1002/jib.526>

HunterLab (2008) Insight on Color: CIE L*a*b* Color Scale. Vol. 8, No. 7.

Indrio F, Gutierrez Castellon P, Vandenplas Y, Cagri Dinleyici E, Francavilla R, Mantovani MP, Grillo A, Beghetti I, Corvaglia L, Aceti A (2022) Health Effects of Infant Formula Supplemented with Probiotics or Synbiotics in Infants and Toddlers: Systematic Review with Network Meta-Analysis. *Nutrients* **14**, 5175. <https://doi.org/10.3390/nu14235175>

Jiang YJ, Guo MR (2014) Infant formula product regulation. Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology, 2. izd., Woodhead Publishing, str. 281-316.

Jung TH, Hwang HJ, Yun SS, Lee WJ, Kim JW, Ahn JY, Jeon WM, Han KS (2017) Hypoallergenic and Physicochemical Properties of the A2 β -Casein Fraction of Goat Milk. *Korean J Food Sci Anim Resour* **37**, 940-947. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.6.940>

Kouwenhoven SMP, Muts J, Finken MJJ, Goudoever JBV (2022) Low-Protein Infant Formula and Obesity Risk. *Nutrients* **14**, 2728. <https://doi.org/10.3390/nu14132728>

Lemaire M, Le Huërou-Luron I, Blat S (2018) Effects of infant formula composition on long-term metabolic health. *J Dev Orig Health Dis* **9**, 573-589. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000964>

Leung AK, Sauve RS (2005) Breast is best for babies. *J Natl Med Assoc* **97**, 1010-1019.

Mabrook MF, Petty MC (2003) Effect of composition on the electrical conductance of milk. *J Food Eng* **60**, 321 – 325 [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00054-2)

Liu Y, Zhou S, Han W, Li C, Liu W, Qiu Z, Chen H. (2021) Detection of Adulteration in Infant Formula Based on Ensemble Convolutional Neural Network and Near-Infrared Spectroscopy. *Foods* **10**, 785. <https://doi.org/10.3390/foods10040785>

Martinis I (2004) Nutritivne alergije. *Medix* **10**, 86-88.

Matijević B, Blažić M (2008) Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* **58**, 151-169.

Mokrzycki W, Tatol M (2011). Color difference Delta E - A survey. *Mach Graph Vis* **20**, 383-411.

Pandiselvam R, Prithviraj V, Manikantan M R, Kothakota A, Rusu A V, Trif M, Mousavi Khaneghah A (2022) Recent advancements in NIR spectroscopy for assessing the quality and safety of horticultural products: A comprehensive review. *Front Nutr* **9**, 973457. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.973457>

Pensabene L, Salvatore S, D'Auria E, Parisi F, Concolino D, Borrelli O, Thapar N, Staiano A, Vandenplas Y, Saps M (2018). Cow's Milk Protein Allergy in Infancy: A Risk Factor for Functional Gastrointestinal Disorders in Children? *Nutrients* **10**, 1716. <https://doi.org/10.3390/nu10111716>

PerkinElmer, Inc., Inorganic Applications Team (2017) Analysis of Milk for Major and Trace Elements by ICP-MS. https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app_013376_01_nexion_2000_icp-ms_milk_app_note.pdf

Pristupljeno 18. lipnja 2023.

Raos N, Kaštelan-Macan M (2015) Imenje i nazivlje u kemiji i kemijskom inženjerstvu: Spektroskopija i spektrometrija – drugi put. *Kem ind* **64**, 652-652.

Rumbak I (2018) Prehrana u dojenačkoj dobi, interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Salminen S, Stahl B, Vinderola G, Szajewska H (2020) Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. *Nutrients* **12**, 1952. <https://doi.org/10.3390/nu12071952>

Schläpfer, K. (1993) Farbmeterik in der reproduktionstechnik und im mehrfarbendruck, Švicarska.

Strgar Kurečić, M. (2023) Kontrola boja - od percepcije do mjerenja. http://repro.grf.unizg.hr/media/download_gallery/OSNOVE%20O%20BOJI.pdf. Pristupljeno 11. travnja 2023.

Sun D, Cruz J, Alcalá M, Romero del Castillo R, Sans S, Casals J (2021) Near infrared spectroscopy determination of chemical and sensory properties in tomato. *JNIRS*, **29**, 289-300. <https://doi.org/10.1177/09670335211018759>

Urashima T, Hirano D, Gocho N, Tachimoto H (2019) Primary Prevention of Cow's Milk Sensitization and Food Allergy by Avoiding Supplementation With Cow's Milk Formula at Birth: A Randomized Clinical Trial. *JAMA pediatrics* **173**, 1137–1145. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2019.3544>

Vandenplas Y, Hauser B, Salvatore S (2019) Functional Gastrointestinal Disorders in Infancy: Impact on the Health of the Infant and Family. *PGHN* **22**, 207–216. <https://doi.org/10.5223/pghn.2019.22.3.207>

Wang X, Zhong J (2019) Near-infrared spectroscopy for food quality evaluation. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Evaluation Technologies for Food Quality, Woodhead Publishing, str. 105-118 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00007-X>.

Young B (2020) Variation in Infant Formula Macronutrient Ingredients Is Associated with Infant Anthropometrics. *Nutrients*, **12**, 3465. <https://doi.org/10.3390/nu12113465>

WHO (2009) Weight-for-age Charts: Boys Chart- Weight-for-age: Birth to 2 years (percentiles). WHO-World Health Organization, <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards/weight-for-age> Pristupljeno 7. lipnja 2023.

WHO (2009) Weight-for-age Charts: Girls Chart- Weight-for-age: Birth to 2 years (percentiles). WHO-World Health Organization, <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards/weight-for-age> Pristupljeno 7. lipnja 2023.

Zhao X, Wang Y, Liu X, Jiang H, Zhao Z, Niu X, Li C, Pang B, Li Y. (2022) Single- and Multiple-Adulterants Determinations of Goat Milk Powder by NIR Spectroscopy Combined with Chemometric Algorithms. *Agriculture* **12**, 434. <https://doi.org/10.3390/agriculture12030434>

7. PRILOZI

Prilog 1. Nutritivne i energetske vrijednosti ispitivanih dojenačkih formula (prema nutritivnoj deklaraciji)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1			jedinice	Dojenačka formula A	Dojenačka formula B	Dojenačka formula C	Dojenačka formula D	Dojenačka formula E
2	E kJ		kJ/100 mL pripremljenog napitka	276	278	420	281	284
3	E kcal		kcal/100 mL pripremljenog napitka	66	67	100	67	68
4	masti		g	3,6	3,6	4,6	3,5	3,6
5		ZMK	g	1,5	1,5	2	1,4	1,3
6		Jednostruko NMK	g	1,6	1,6	1,6		1,7
7		višestruko NMK	g	0,5	0,5	1,6		0,6
8		linolna (omega 6)	g	0,4	0,4		0,6	0,51
9		arahidonska	mg	13,2	13,4		4	
10		linolenska (omega 3)	g	0,06	0,06		0,58	0,054
11		DHA	mg	13,2	13,4		16	13,9
12	CHO		g	7	7,1	11,8	7	7,5
13		šećeri	g	7	5,9	1,1	0,2	4
14		laktoza	g	6,9	5,9			3,8
15		inozitol	mg	4,2	4,2		3,4	3,6
16		škrob	g		1		0,1	
17	Vlakna		g	0,3	0,3	0	0,5	
18		galaktooligosaharidi	g	0,3	0,3			
19	proteini		g	1,28	1,3	2,8	1,6	1,4
20		karnitin	mg	1,8	1,8			
21	minerali							
22	natrij		mg	20	20	60,1	22	19
23	kalij		mg	76	77	115	82	72,8
24	klorid		mg	51	52	92,2	54	75,9
25	kalcij		mg	51	52	90,3	81	60,7
26	fosfor		mg	30	30	65,2	45	41,8
27	magnezij		mg	4,5	4,5	14	6,8	6,2
28	elementi u tragovima							
29	željezo		mg	0,5	0,6	1,2	1,1	0,67
30	cink		mg	0,5	0,5	1,1	0,5	0,46
31	bakar		mg	0,053	0,054	0,1	0,05	0,048
32	mangan		mg	0,005	0,005	0,06	0,007	0,0058
33	fluorid		mg	<0,0050	<0,0050		<0,06	0,0059
34	selen		microg	3,8	3,9	3,2	3	2,4
35	jod		microg	15	15	15	14	13,6
36	krom		microg			1,6	<6,1	
37	molibden		microg			4,5	<6,1	
38	vitamini							
39	vitamin A		microg	54	55	45,2	59	54,1
40	vitamin D		microg	1,5	1,5	1,3	1,6	1,5
41	vitamin E		mg	0,7	0,7	1,4	1,2	1,3
42	vitamin K		microg	5,1	5,2	4	4,1	5,1
43	vitamin C		mg	8,9	8,9	10	8,1	9,2
44	Vitamin B1 (tiamin)		mg	0,05	0,05	0,1	0,11	0,052
45	Vitamin B2 (riboflavin)		mg	0,14	0,14	0,2	0,2	0,077
46	niacin		mg	0,34	0,34	1,1	0,6	0,38
47	vitamin B6		mg	0,029	0,029	0,1	0,08	0,038
48	folna kiselina		microg	0,12	10	15	11	12,5
49	folati		microg DFE				18	20,9
50	vitamin B12		microg	0,12	0,1	0,25	0,2	0,16
51	biotin		microg	1,5	1,5	3	2	2,1
52	pantotenska kiselina		mg	0,34	0,34	0,4	0,7	0,34
53	ostalo		mg					
54		kolin	mg	25	26	20	23	21
55		taurin	mg			6,6	5,4	
56		L-karnitin	mg			3,3	2,7	1
57		mio inozitol	mg			5,5		

Prilog 2. Nutritivni sastav dojenačkih formula (prema deklaraciji)

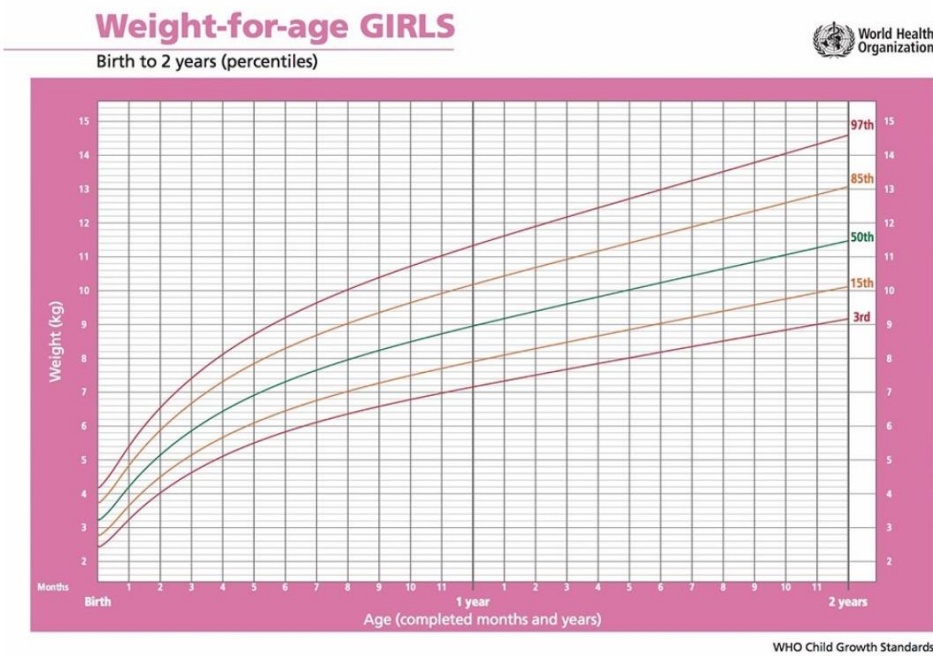
	A	B	C	D	E	F	G
			Dojenačka formula A	Dojenačka formula B	Dojenačka formula C	Dojenačka formula D	Dojenačka formula E
1							
2	obrano mlijeko		+	+			
3	hidrolizat mliječnih bjelančevina					+	
4	punomasno kozje mlijeko u prahu						+
5	suhi glukozni sirup				+		
6	pripravak sirutke		+	+			
7	biljna ulja		+	+	+	+	+
8	palmino ulje		+	+		+	
9	kanola				+		
10	kokosovo				+	+	
11	repičino ulje		+	+		+	+
12	suncokretovo ulje		+	+	+	+	+
13	suncokretovo ulje bogato oleinskom kiselinom				+		
14	ulje gljive <i>Mortierella alpina</i>		+	+		+	
15	ulje mikroalge <i>Schizochytrium sp.</i>					+	
16	ulje mikroalge <i>C. Cohnii</i>						+
17	ulje palminih koštica				+		
18	laktoza		+	+			+
19	galaktooligosaharidi iz laktoze		+	+			
20	riblje ulje		+	+			
21	DHA					+	
22	AHA					+	
23	prirodne kulture bakterija mliječne kiseline						
24	Limosilactobacillus fermentum hereditum		+	+			
25	škrob					+	
26	tapioka škrob						
27	kolin		+	+			
28	L-kolin						+
29	kalcijevi ortofosfati		+	+	+		
30	natrijevi ortofosfati				+		
31	kalijski ortofosfati				+		
32	kolin bitartrat				+	+	
33	glicin				+		
34	L-prolin				+		
35	L-metionin				+		
36	L-alanin				+		
37	L-arginin				+		
38	L-leucin				+		
39	L-lizin acetat				+		
40	L-serin				+		
41	L-glutamin				+		
42	L-fenilalanin		+	+	+	+	
43	L-histidin		+	+	+	+	
44	L-valin				+		
45	L-izoleucin				+	+	
46	L-tirozin				+	+	+
47	L-treonin				+		
48	L-triptofan		+	+	+	+	+
49	L-karnitin				+	+	+
50	L-cistin				+	+	+
51	kalcijev fosfat					+	
52	trikalcijev fosfat					+	
53	dikalcijski fosfat					+	
54	kalijski klorid		+	+			
55	natrijski klorid				+		+
56	kalcijev klorid				+	+	
57	magnezijski klorid				+	+	+
58	kromov klorid				+		
59	natrijski citrat		+	+			+
60	trinatrijski citrat					+	
61	kalcijev citrat				+		
62	kalijski citrat				+		
63	trikalcijev citrat					+	
64	kalcijev hidroksid						+
65	trikalcijev citrat					+	
66	kalijski hidroksid						
67	kalijski jodid				+	+	
68	kalijski jodat		+	+			+
69	kalcijev karbonat		+	+	+		+
70	magnezijski karbonat						
71	L-sulfat						
72	bakrov sulfat		+	+	+	+	+
73	željezov sulfat		+	+	+		
74	cinkov sulfat		+	+	+	+	+
75	magnezijski sulfat		+	+			
76	manganov sulfat		+	+	+	+	+
77	natrijski selenit		+	+	+	+	+
78	natrijski selenat						
79	natrijski molibdat				+		
80	željezov laktat						+
81	željezov difosfat					+	
82	vitamin A		+	+	+	+	+
83	vitamin D		+	+	+	+	+
84	vitamin E		+	+	+	+	+
85	vitamin K		+	+	+	+	+
86	vitamin C		+	+	+	+	+
87	vitamin B1 (tiamin)		+	+	+	+	+

Prilog 2 – nastavak

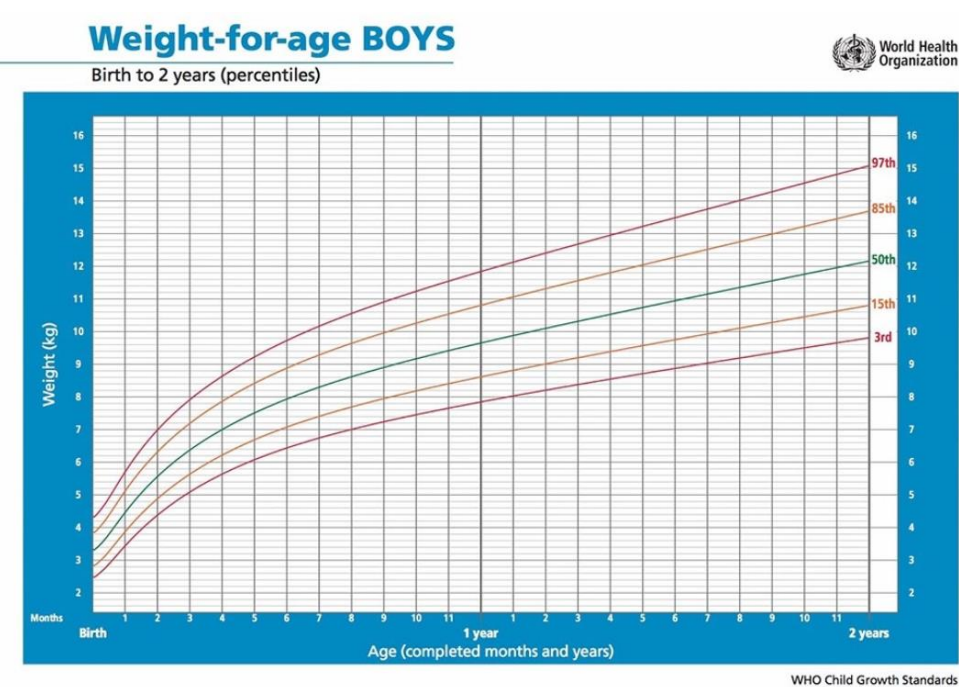
87	vitamin B1 (tiamin)	+	+	+	+	+
88	vitamin B2 (riboflavin)	+	+	+	+	+
89	vitamin B3 (niacin)	+	+	+	+	+
90	vitamin B5 (pantotenska kiselina)	+	+	+	+	+
91	vitamin B6 (piridoksin)	+	+	+	+	+
92	biotin	+	+	+	+	+
93	folna kiselina			+	+	+
94	kalcijev-L-metilfolat	+	+			
95	vitamin B12 (cijanokobalamin)	+	+	+	+	+
96	taurin			+	+	
97	inozitol			+	+	+
98	mliječna kiselina (stabilizator)	+	+			
99	maltodekstrin			+	+	+
100	emulgatori					
101	E472c - esteri limunske kiseline			+		
102	suncokretov lecitin				+	
103	antioksidansi					
104	E322 - suncokretov lecitin			+		
105	ekstrakt bogat tokoferolima				+	
106	E304 - askorbil palmitat			+	+	
107	zgušnjivači					
108	pektin				+	
109	brašno				+	
110	siemenke rogača				+	

Prilog 3. Percentilne krivulje za djevojčice i dječake (WHO, 2009)

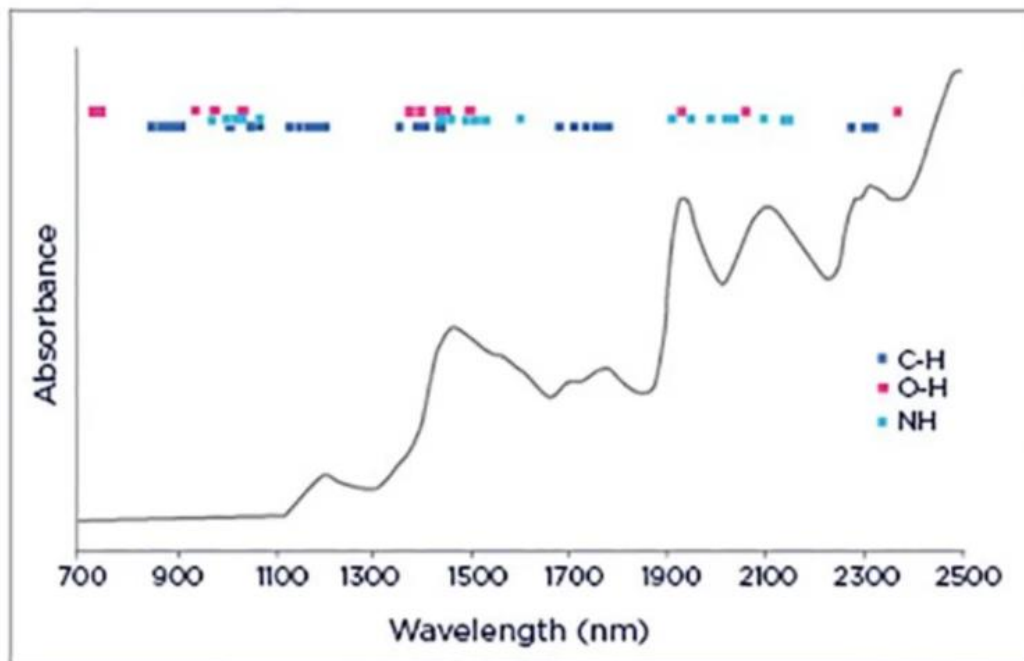
Prilog 3a. Percentilne krivulje za djevojčice



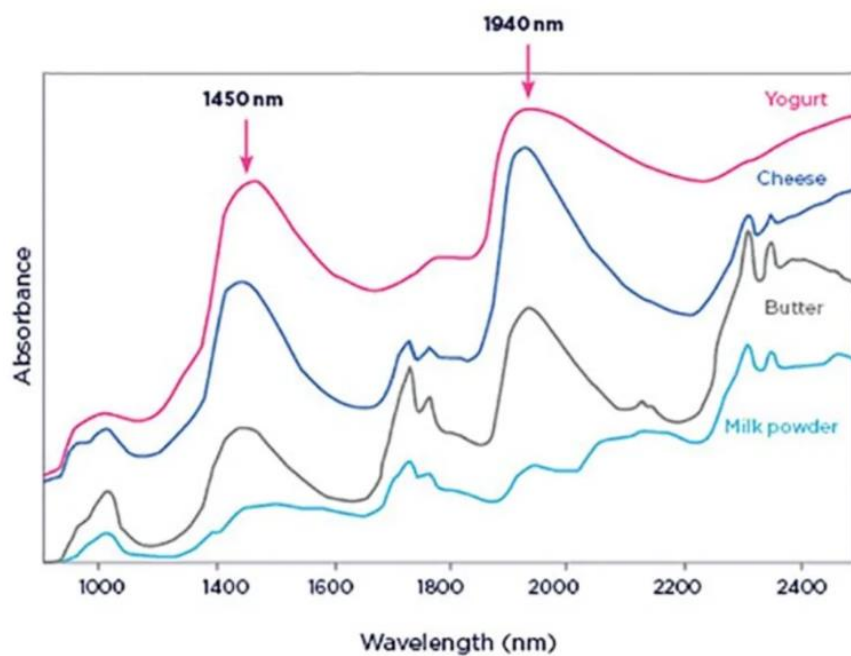
Prilog 3b. Percentilne krivulje za dječake



Prilog 4. Apsorpcijska vrpca (AB Vista, 2018)

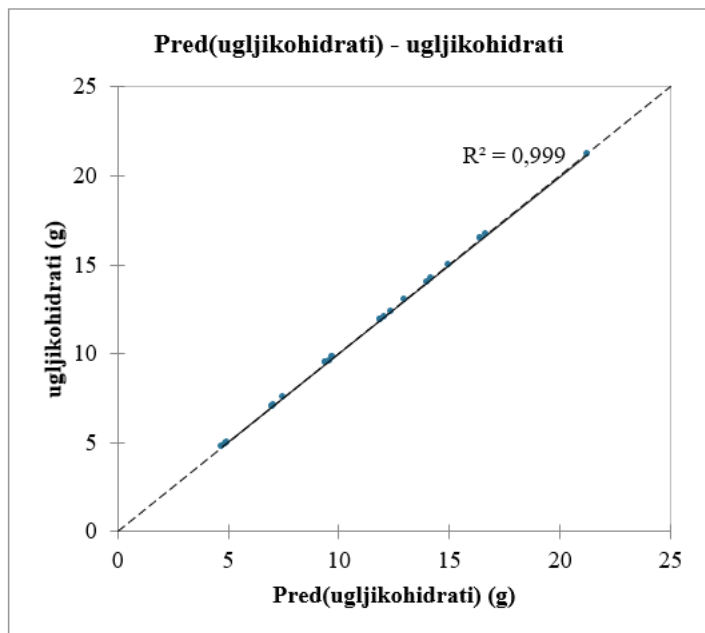


Prilog 5. NIR spektar za mlijeko u prahu (AB Vista, 2018)

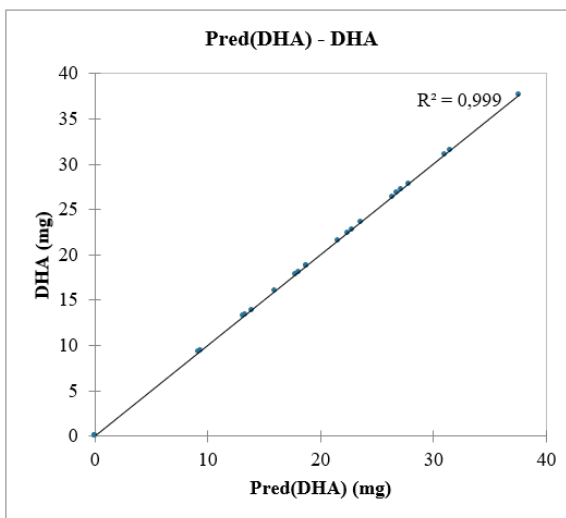
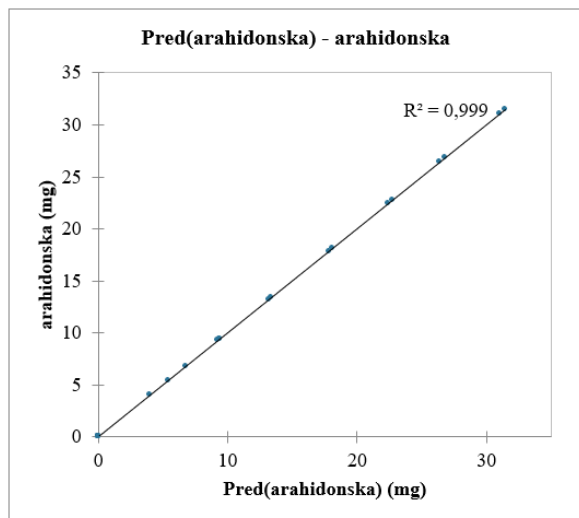
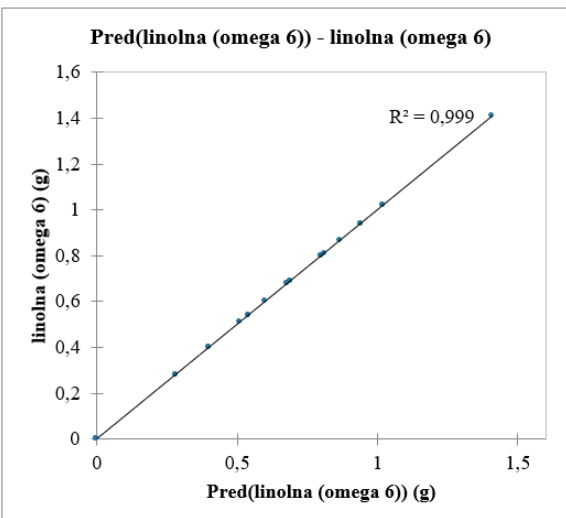
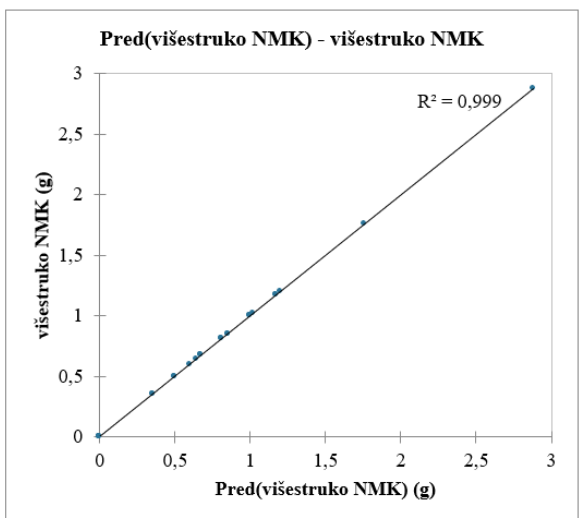
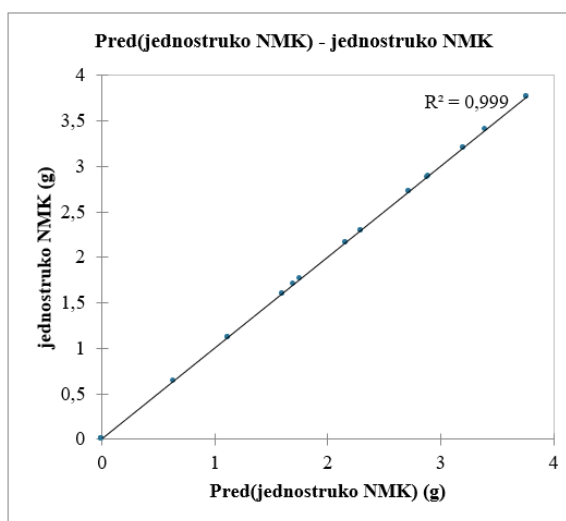
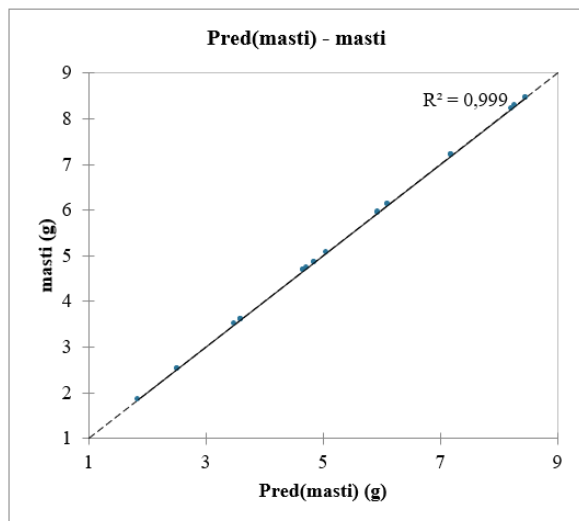


Prilog 6. Regresija glavnih komponenata (PCR) za makronutrijente

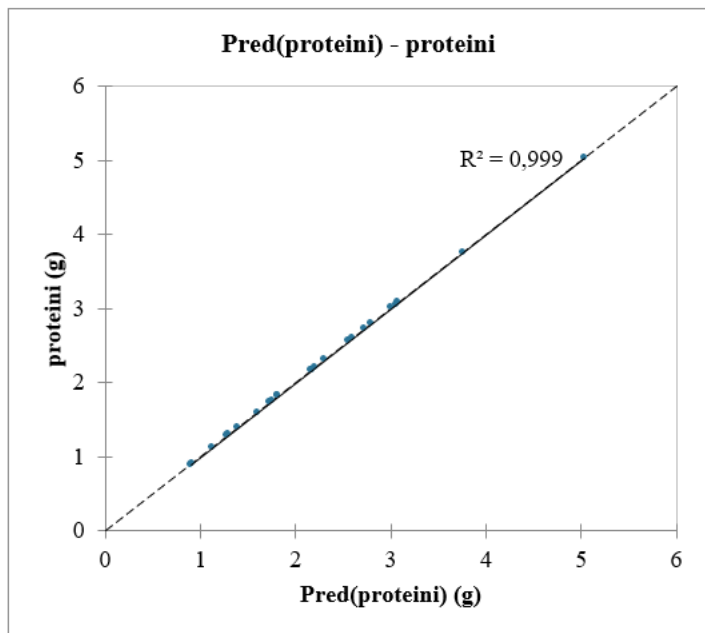
Prilog 6a. Regresija glavnih komponenata za ugljikohidrate



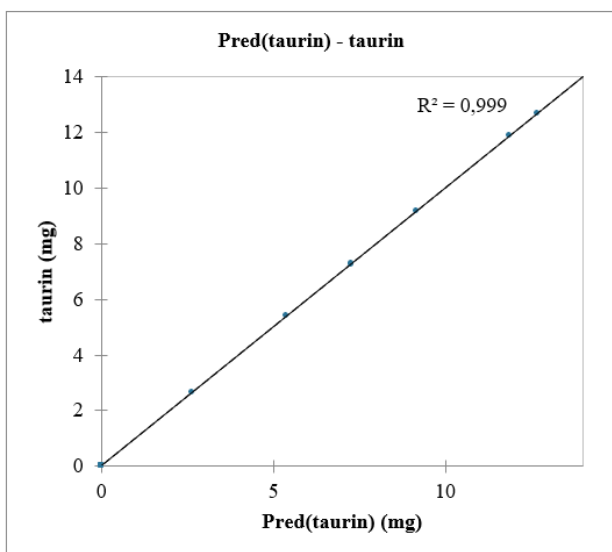
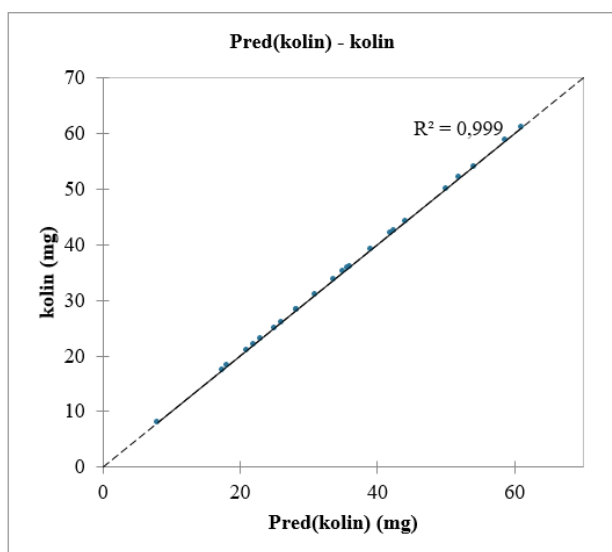
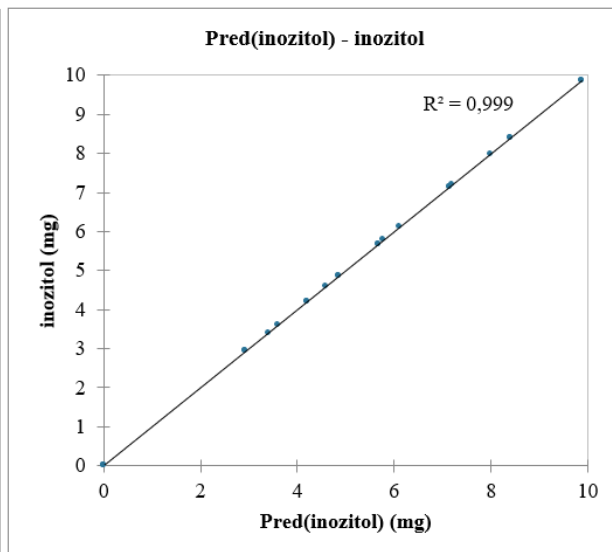
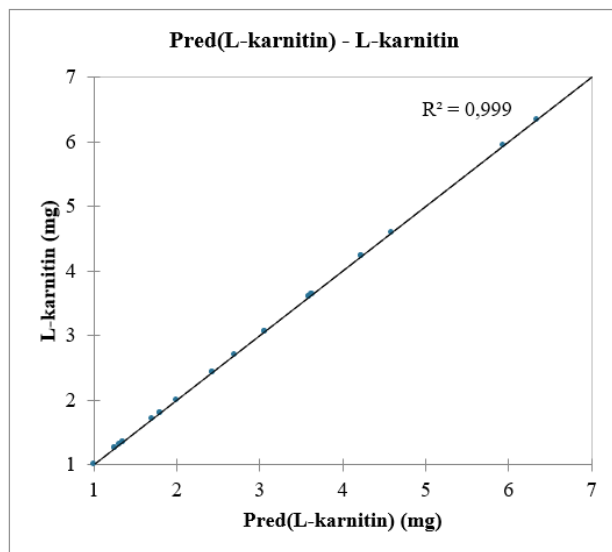
Prilog 6b. Regresija glavnih komponenata za masti



Prilog 6.c Regresija glavnih komponenata za proteine

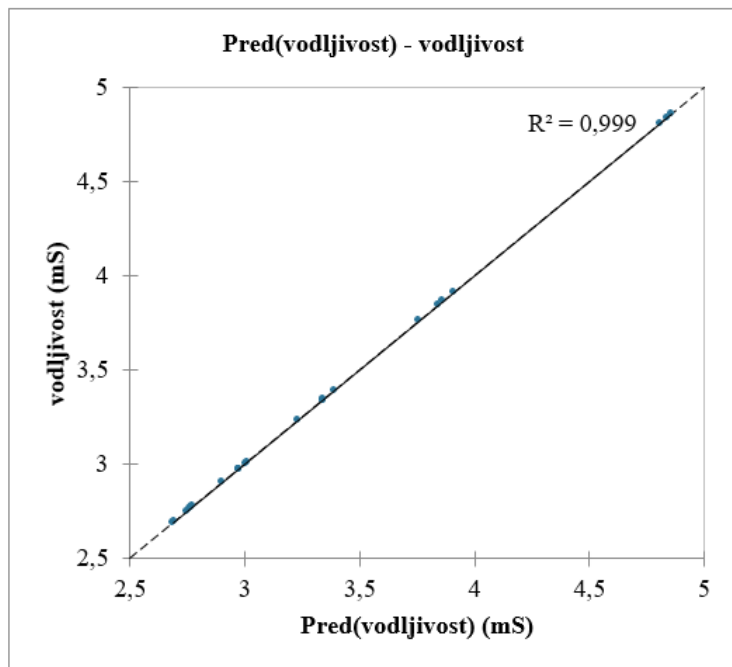


Prilog 7. Regresija glavnih komponenata za mikronutrijente

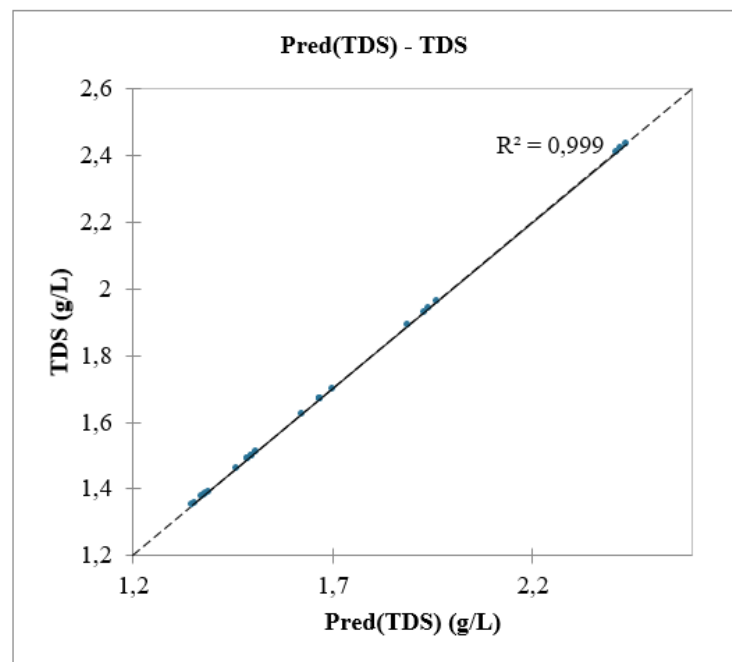


Prilog 8. Regresija glavnih komponenata za vodljivost i TDS

Prilog 8a. Regresija glavnih komponenata za vodljivost



Prilog 8b. Regresija glavnih komponenata za TDS



IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Iva Majić, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis