Primjena tekućinske kromatografije na određivanje (2E)-10-hidroksidec-2-enske kiseline u matičnoj mliječi

Jakovljević, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:185700

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Martina Jakovljević

PRIMJENA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE ZA ODREĐIVANJE (2*E*)-10-HIDROKSIDEC-2-ENSKE KISELINE U MATIČNOJ MLIJEČI

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za kakvoću hrane
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i nutricionizam

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode I
Tema rada je prihvaćena na IX (devetoj) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 28 lipnja 2016.
Mentor: doc. dr. sc. *Ivana Flanjak*
Pomoć pri izradi: *Blanka Bilić Rajs, mag. ing.*

Primjena tekućinske kromatografije za određivanje (2*E*)-10-hidroksidec-2-enske kiseline u matičnoj mliječi

Martina Jakovljević, 313-DI

Sažetak:

Matična mliječ je proizvod koji izlučuju mlade pčele radilice, a pripisuje joj se višestruko pozitivno djelovanje na organizam. To djelovanje je u najvećoj mjeri rezultat prisutnosti (2*E*)-10-hidroksidec-2-enske kiseline (10-HDA) koja je prisutna isključivo u matičnoj mliječi, pa se njezin udio smatra jednim od kriterija određivanja autentičnosti i kvalitete matične mliječi. Ne postoje međunarodni standardi za kvalitetu matične mliječi niti standardna metoda za određivanje udjela 10-HDA u matičnoj mliječi. HPLC metoda s detektorom s nizom dioda je validirana i upotrjebljena za određivanje udjela 10-HDA u svježoj matičnoj mliječi. Identifikacija 10-HDA provedena je na osnovi usporedbe vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardom 10-HDA, a kvantifikacija je provedena internom kalibracijom. Izvedbene značajke metode pokazale su da je metoda prikladna namjeni. Udio 10-HDA u 5 svježih uzoraka matične mliječi iznosio od 1,56 do 3,78 %. Prema preporukama o parametrima kvalitete matične mliječi koji predlažu da udio 10-HDA iznosi minimalno 1 %, uzorci korišteni u ovom istraživanju su svježi i nekrivotvoreni. Vrsta ambalažnog materijala nema utjecaj na udio 10-HDA u svježoj matičnoj mliječi ako se uzorak nakon vađenja smrzne i skladišti u zamrzivaču.

Ključne riječi: matična mliječ, 10-HDA, HPLC metoda

Rad sadrži: 41 stranica
7 slika
5 tablica
0 priloga
27 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. *Daniela Čačić Kenjerić*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Ivana Flanjak*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*	član
4.	prof. dr. sc. *Ljiljana Primorac*	zamjena člana

Datum obrane: 28.rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Food Quality
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food science and nutrition

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Instrumental methods of analysis I
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX (the ninth) held on June 28, 2016.
Mentor: *Ivana Flanjak*, PhD, assistant prof.
Technical assistance: *Blanka Bilić Rajs, BSc*

(2*E*)-10-hydroxydec-2-enoic acid in royal jelly as determined by liquid chromatography

Martina Jakovljević, 313-DI

Summary:
Royal jelly is a product secreted by young worker bees, which has multiple positive effects on human health. They are mainly result of the presence of (2*E*)-10-hydroxydec-2-enoic acid (10-HDA), a component present only in royal jelly and its content is considered as one of the criteria for determining the authenticity and quality of royal jelly. There is neither international standard for the royal jelly quality nor standard method for determination of 10-HDA in royal jelly samples. HPLC method with absorbance detection was validated and used for the determination of 10-HDA in fresh royal jelly samples. Identification of the 10-HDA was performed based on comparison of retention times and absorbance spectrum 10-HDA of royal jelly sample compared with the spectrum of standard 10-HDA, and quantification was carried out by internal calibration. Method performance characteristics showed that the method was fit for purpose. The 10-HDA content in 5 fresh royal jelly samples was from 1.56 to 3.78 %. According to the recommendations on the royal jelly quality, that proposed a minimum 10-HDA content of 1 %, samples used in this study are fresh and authentic. Packaging type has no effect on 10-HDA content in fresh royal jelly, if samples are frozen after extraction and kept in freezer until analysis.

Key words: royal jelly, 10-HDA, HPLC method

Thesis contains: 41 pages
7 figures
5 tables
0 supplements
27 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Daniela Čačić Kenjerić*, PhD, prof. — chair person
2. *Ivana Flanjak*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Ivica Strelec*, PhD, associate prof. — member
4. *Ljiljana Primorac*, PhD, prof. — stand-in

Defense date: September 28, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Flanjak na neizmjernoj pomoći, strpljenju, potpori i vremenu tijekom cijele izrade rada. Zahvaljujem svojim roditeljima i ostaloj obitelji na povjerenju u mene svih ovih godina, odricanju i pružanju potpore i kada se sve činilo nedostižno. Zahvaljujem i svojim prijateljima, a ponajviše onima koje sam ovdje upoznala, koji su sve ove godine učinili posebnim i za koje se nadam da de to činiti i ostatak života. I za kraj, zahvaljujem svom dečku koji je uz mene bio sve godine, slušao sve o profesorima, ispitima i problemima pozorno uvjeravajući me u pozitivan ishod.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. MATIČNA MLIJEČ 4

2.1.1. Proizvodnja matične mliječi 4

2.1.2. Kemijski sastav matične mliječi 6

2.1.3. Zdravstveni aspekt uporabe matične mliječi 9

2.2. AUTENTIČNOST MATIČNE MLIJEČI 13

2.3. METODE ODREĐIVANJA (2*E*)-10-HIDROKSIDEC-2-ENSKE KISELINE U MATIČNOJ MLIJEČI 16

2.3.1. Kromatografske metode 16

2.3.2. Kapilarna elektroforeza 18

2.3.3. Prednosti LC u odnosu na druge tehnike 18

2.3.4. Visoko tlačna tekućinska kromatografija 19

3. EKSPERIMENTALNI DIO 22

3.1. ZADATAK 23

3.2. MATERIJAL I METODA 23

3.2.1. Uzorci 23

3.2.2. Metoda 23

4. REZULTATI 26

5. RASPRAVA 32

6. ZAKLJUČCI 37

7. LITERATURA 39

Popis oznaka, kratica i simbola

10-HDA	(2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina
CDER	Centar za istraživanje i ocjenu lijekova Američke uprave za hranu i lijekove (engl. *Center for Drug Evaluation and Research)*
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations)*
HPLC	Visokotlačna tekućinska kromatografija (engl. *High pressure liquid chromatography*)
ISO	Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization)*
IHC	Međunarodna komisija za med (engl. *International Honey Commission*)

1. UVOD

Matična mliječ je žućkasto-bijeli, kiseli proizvod koji izlučuju mandibularne i hipofaringealne žlijezde mladih pčela radilica prvenstveno za razvoj i održavanje matice. Matična mliječ se sastoji od proteina, aminokiselina, šećera, lipida, vitamina i minerala, a zbog karakterističnog nutritivnog sastava, prepoznata je kao dodatak prehrani te se koristi i u kozmetičke svrhe (Bărnuţiu i sur., 2011). Pripisuje joj se višestruko pozitivno djelovanje na organizam, uključujući kvalitetniji život i liječenje lakših bolesti, no mnoge od tih tvrdnji potrebno je detaljnije klinički istražiti i znanstveno dokazati (Oršolić, 2013).

(2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina (10-HDA) je nezasićena masna kiselina koja se u prirodi pojavljuje samo u matičnoj mliječi te se upravo zbog toga smatra jednim od kriterija određivanja autentičnosti i kvalitete matične mliječi (Bărnuţiu i sur., 2011). Zahtjevi za minimalnu koncentraciju 10-HDA u svježoj i nekrivotvorenoj matičnoj mliječi su različiti ovisno o standardima i državama, a zadnju preporuku daju Kanelis i sur. (2015) koji navode da u svježoj, nekrivotvorenoj matičnoj mliječi koncentracija treba iznositi od 1,0 % do 6,0 %.

U literaturi su opisane različite metode za određivanje sadržaja 10-HDA u matičnoj mliječi: visokotlačna tekućinska kromatografija (Zhou i sur., 2007a; Kim i Lee, 2010), plinska kromatografija (Isidrov i sur., 2012), kapilarna elektroforeza (Ferioli i sur., 2007; Muñoz i sur., 2011) te tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (Zhou i sur., 2007b). Međutim, visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) ima određene prednosti u pogledu preciznosti, osjetljivosti i jednostavnog rukovanja (Kim i Lee, 2010).

Cilj rada bio je validirati HPLC metodu, odrediti udio 10-HDA u uzorcima svježe matične mliječi, te ispitati utjecaj vrste ambalažnog materijala na udio 10-HDA.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MATIČNA MLIJEČ

Matična mliječ je proizvod koji izlučuju mandibularne i hipofaringealne žlijezde mladih pčela radilica prvenstveno za razvoj i održavanje matice (Bărnuţiu i sur., 2011). Radi se o viskoznoj, želatinoznoj tvari žućkasto-bijele boje (**Slika 1**) s malo oporim, kiselim mirisom i kiselo-slatkim okusom (Bogdanov, 2016).



Slika 1 Svježa matična mliječ (Lifemartini.com, 2016)

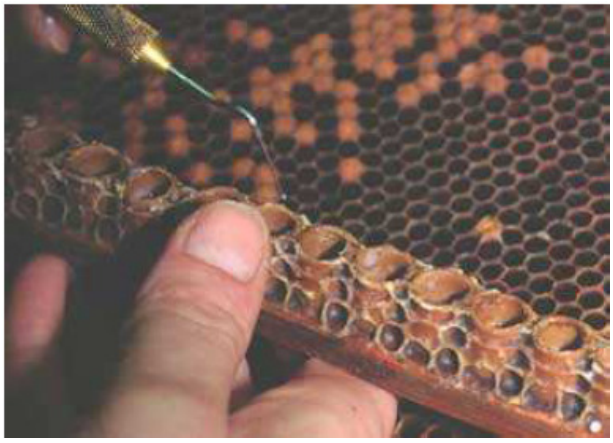
2.1.1. Proizvodnja matične mliječi

Tokom prva tri dana svoga života matičnom mliječi se hrane sve ličinke, uključujući ličinke pčela radilica, trutova te matica. Razlika u ishrani se javlja nakon tog perioda, kada se ličinke pčela radilica i trutovi hrane kombinacijom meda i peludi, dok se ličinke matice nastavljaju hraniti matičnom mliječi. Značajne razlike u morfologiji, razdoblju razvoja, životnom vijeku i ponašanju između matice i pčela radilica su povezane sa ishranom tijekom stadija razvoja, te se upravo matična mliječ smatra jednim od glavnih razloga za navedene razlike (Ferioli i sur., 2007).

Matična mliječ se proizvodi na dva načina: kontinuiranom i nekontinuiranom metodom, odnosno uz i bez prisutnosti matice. Prema pčelarima, bolja opcija je kontinuirana metoda, odnosno uz prisutnost matice zbog manjih troškova proizvodnje i mogućnosti skupljanja matične mliječi kroz cijelu pčelarsku sezonu (Krmpotić, 2014; Bogdanov, 2016). Glavni faktori za proizvodnju matične mliječi su uzgoj sojeva pčela koje proizvode veće količine matične mliječi, jaka pčelinja zajednica, optimalan broj stanica po zajednici, dovoljne količine hrane i

vode te suha i čista prostorija za manipulaciju i skladištenje matične mliječi. Uz to, vrlo je važno prilagoditi ciklus vađenja matične mliječi te koristiti leglo odgovarajuće dobi (Bogdanov, 2016). U ovom slučaju potrebne su mlade pčele starosti 5 - 15 dana jer su one jedine sposobne lučiti matičnu mliječ, a kako je najveći broj mladih pčela u zajednici tijekom svibnja, lipnja, srpnja, tada se i proizvodnja matične mliječi najviše isplati (Krmpotić, 2014).

Za proizvodnju matične mliječi uz prisutnost matice LR košnicu nije potrebno posebno prilagođavati. Ukratko opisano, jezgra koja se sastoji od matice, zajedno s malim dijelom zajednice smjesti se pored matične zajednice. Nakon svakog skupljanja matične mliječi jezgra s maticom i matična zajednica bez matice se izmjenjuju, tako da matica ima više prostora za polaganje te se nove pčele radilice i ličinke mogu prenijeti iz jezgre u zajednicu u kojoj nema matice (Bogdanov, 2016). Presađivanje je vrlo važan posao koji se treba obaviti što preciznije za što se danas uglavnom koristi kineska igla te što brže nakon čega se okvir što prije odnosi na pripremljenu zajednicu (**Slika 2**). Presađuju se ličinke stare 24 sata jer ukoliko se presadi starija ličinka, potrošit će sama veći dio matične mliječi. Dodani matičnjaci u košnici ostaju 72 sata tijekom kojih je nužno osigurati dovoljnu količinu hrane ili u lošijim pašnim uvjetima umetnuti ram hranilicu sa pogačom, koja će predstavljati stalni izvor hrane. Nakon 72 sata okvir s matičnjacima se vadi i pristupa se vađenju matične mliječi pri čemu se prvo ugrijanim skalpelom ili nožem odsijeca vrh matičnjaka i vade se ličinke. Prvo se štapićem ili sisaljkom mliječ vadi iz tako pripremljenog matičnjaka. Važno je pripaziti da se prilikom manipulacije s matičnom mliječi koristi samo drveni ili plastični alat. Odmah nakon vađenja mliječi, u iste te matičnjake presađuju se nove ličinke i vraćaju u košnicu. Taj proces se zatim ponavlja opet nakon 72 sata (Krmpotić, 2014).



Slika 2 Presađivanje ličinki (Bogdanov, 2016)

2.1.2. Kemijski sastav matične mliječi

Matična mliječ je bogata bjelančevinama, ugljikohidratima, lipidima te vitaminima i mineralima (Bărnuţiu i sur., 2011). Ima jedinstven sastav te posjeduje visoku nutritivnu vrijednost zahvaljujući nabrojanim komponentama i veliku biološku aktivnost (Lalić, 2013).

Tablica 1 Prikaz sastava svježe matične mliječi (Sabatini i sur.,2009)

Sastav	Svježa matična mliječ
Voda (%)	60-70
Lipidi (%)	3-8
10-HDA (%)	>1,4
Proteini (%)	9-18
Fruktoza (%)	3-13
Glukoza (%)	4-8
Saharoza (%)	0,5-2,0
Fruktoza+glukoza+saharoza (%)	7-18
Pepeo (%)	0,8-3,0
pH	3,4-4,5
Kiselost (mL 0,1 N NaOH/g)	3,0-6

Kako je vidljivo u **Tablici 1**, najveći udio u svježoj matičnoj mliječi čini voda, i to 60 - 70 %. Konstantnost sadržaja vode osigurana je kontinuiranim osiguravanjem svježih zaliha matične mliječi radom pčela radilica, prirodnom higroskopnosti matične mliječi i radom cijele zajednice kako bi se održala razina vlage u košnici. Varijacije u sadržaju vode mogu se objasniti netopljivošću nekih komponenata matične mliječi te vremenom skupljanja (Sabatini i sur., 2009). Većina proizvođača matičnu mliječi skuplja treći dan nakon presađivanja, no ukoliko se mliječ skuplja četvrti dan sadržaj vode se smanjuje (< 50 %) s obzirom da pčele troše dio vode. S druge strane, ranijim skupljanjem matične mliječi, dan ili dva nakon presađivanja također dolazi do nižeg sadržaja vode (< 60 %) u krajnjem proizvodu (Kanelis i sur., 2015).

Prema **Tablici 1**, udio lipida u svježoj matičnoj mliječi iznosi 3 - 8 %. Sama struktura masnih kiselina je neuobičajena, radi se primarno o mono- i dihidroksi kiselinama te dikarboksilnim masnim kiselinama kratkog lanca (8 - 10 atoma ugljika) (Sabatini i sur., 2009; Ferioli i sur., 2007). Lipidni dio matične mliječi čine masne kiseline (80 - 85 %), fenoli, (4 - 10 %), vosak (5 - 6 %), steroidi (3 - 4 %) i fosfolipidi (0,4 - 0,8 %). Specifične masne kiseline matične mliječi, karakteristične isključivo za matičnu mliječ su (2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina (10-HDA) te 10-hidroksidecenska kiselina (HDAA) (Oršolić, 2013).

(2*E*)-10-hidroksidec-2-enska kiselina (10-HDA) je nezasićena masna kiselina koja se u prirodi pojavljuje samo u matičnoj mliječi. Zastupljenija je od HDAA te se zbog toga njezina količina i smatra jednim od kriterija određivanja autentičnosti i kvalitete, a zahtjevi su različiti ovisno o standardima i državama (Sabatini i sur., 2009). Minimalni sadržaj 10-HDA u nekrivotvorenoj i svježoj matičnoj mliječi prema ISO i IHC standardima iznosi 1,4 %, prema Antinelli i sur. (2003) preporuka je 1,8 %, dok Kanelis i sur. (2015) predlažu 1,0 % kao donju granicu jer je nekoliko studija pokazalo da 10-HDA može biti prisutna u autentičnim uzorcima matične mliječi i u nižim koncentracijama. Rezultati analiza pokazali su da je koncentracija 10-HDA niža kod europskih uzoraka matične mliječi u odnosu na kineske uzorke (Oršolić, 2013).



Slika 3 Strukturna formula 10-HDA (Cayman chemical, 2016)

Prema **Tablici 1** proteini čine značajne količine matične mliječi, odnosno oko polovine suhe tvari te su uglavnom topivi u vodi (Oršolić, 2013). Frakcije proteina matične mliječi sadrže mnogo vrijednih komponenti i biološki aktivnih tvari (Bărnuţiu i sur., 2011). Više od 80 % topivih proteina, tzv. glavni proteini matične mliječi (MRJPs, engl. *major royal jelly proteins*), glavni su čimbenici odgovorni za specifičnu fiziološku ulogu matične mliječi u razvoju matice te uključuju brojne esencijalne aminokiseline. Prema ranijim izvješćima skupina MRJP koja čini većinu topljivih proteina (31 %), sastoji se od devet komponenti različitih po masi i funkciji. Slobodne aminokiseline čine 0,6 – 1,5 %, a od toga su u najvećoj mjeri prisutni prolin, lizin, glutaminska kiselina, β-alanin, fenilalanin, asparaginska kiselina i serin (Oršolić, 2013; Bogdanov, 2016). Razlike u broju i količini slobodnih aminokiselina povezane su sa specifičnostima uzimanja uzoraka matične mliječi i naknadne pripreme za analizu (Isidorov i

sur., 2012). Uz to, u matičnoj mliječi karakterizirani su i brojni enzimi koji kataliziraju različite biokemijske reakcije u organizmu, kao što su glukoza oksidaza, invertaza, kiselinska i alkalna fosfataza, alfa i beta esteraza, aminopeptidaza te superoksid dismutaza (Bogdanov, 2016).

Ugljikohidrati u prosjeku čine oko 30 % suhe tvari matične mliječi. Unatoč tome što se za provjeru kvalitete matične mliječi u obzir uzimaju fruktoza, glukoza i saharoza, moguće je pronaći druge ugljikohidrate kao što su trehaloza, maltoza, gentibioza, izomaltoza te rafinoza u vrlo malim koncentracijama (Bărnuţiu i sur., 2011).

Matična mliječ je bogata mineralima, posebno kalijem, magnezijem, kalcijem, željezom, fosforom, sumporom, manganom, silicijem, olovom i drugima (Bărnuţiu i sur., 2011). Prema **Tablici 1** sadržaj pepela čini 0,8 – 3,0 % matične mliječi. Hipoteze o kvantitativnoj prisutnosti navedenih komponenti su usmjerene na čimbenike izvan košnice (okoliš, nabava hrane, vrijeme proizvodnje) te do neke mjere na unutarnje čimbenike (biološki čimbenici vezani uz pčele) (Sabatini i sur., 2009; Ramadana i sur., 2012).

U sastavu matične mliječi nalaze se i vitamini B1, B2, B6, B5, B8, B9, te u tragovima vitamin C i niacin (B3) (Sabatini i sur., 2009). Brojni manji spojevi, koji pripadaju različitim kemijskim kategorijama, su identificirani u matičnoj mliječi, uključujući heterocikličke spojeve biopterin i neopterin, nukleotide kao slobodne baze (adenin, gvanin, uracil, timin, citozin), fosfate AMP, ADP i ATP, glukonsku i benzojevu kiselinu te male količine jabučne, mliječne i limunske kiseline (Bogdanov, 2016). U mliječi se nalaze još i neuroprijenosnici (acetilkolin i kolin) i spolni hormoni (estradiol, testosteron, progesteron) (Oršolić, 2013).

Kemijski sastav matične mliječi ostaje relativno konstantan kod usporedbe između različitih zajednica, pčelinjih pasmina i varijacija u temperaturi, a razlike u sastavu objašnjavaju se kao posljedica razlika u ishrani u pojedinim zajednicama, čak i na istom pčelinjaku, ili različitim stupnjevima čistoće stanice gdje matica polaže jaja. Slučajno „onečišćenje“ može se pripisati *p*-kumarinskoj i kafeinskoj kiselini, jer te tvari su tipične komponente propolisa, koje pčele koriste za "poliranje" (Bărnuţiu i sur., 2011; Isidorov i sur., 2012).

2.1.3. Zdravstveni aspekt uporabe matične mliječi

Danas postoji mnogo tvrdnji o dobrobiti matične mliječi ne samo u životinjskom svijetu već i za ljudsku populaciju, uključujući kvalitetniji život i liječenje lakših bolesti. Spektar djelovanja matične mliječi na organizam je višestruk te je danas matična mliječ prihvaćena kao stimulativno i regenerativno sredstvo u obliku dodatka prehrani. Unatoč tome, mnoge od tih tvrdnji potrebno je detaljnije klinički istražiti i znanstveno dokazati. Upravo zbog velikog broja potencijalnih zdravstvenih tvrdnji, iste su svrstane prema PASSCLAIM (*Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods)* klasifikaciji u tematska područja koja obuhvaćaju prehranu i kardiovaskularne bolesti, zdravlje kostiju i osteoporozu, fizičku snagu i kondiciju, regulaciju tjelesne težine, osjetljivost na inzulin i rizik od dijabetesa, prehranu i rak, mentalno stanje i učinkovitost, zdravlje crijeva, probavu i imunost (Bărnuţiu i sur., 2011; Oršolić, 2013). Međutim, prema Uredbi Europske Unije 432/2012 nijedna zdravstvena tvrdnja o matičnoj mliječi nije prihvaćena jer nema dovoljno znanstvenih dokaza kako bi se potvrdio zdravstveni učinak (Vujić i Pollak, 2015). S obzirom na kompleksnost matične mliječi te brojne znanstveno nedokazane tvrdnje, u novijim se istraživanjima provodi pročišćavanje i proučavanje biološke učinkovitosti pojedinih bioaktivnih molekula koje ona sadrži kako bi se provjerile navedene tvrdnje (Oršolić, 2013).

Načini upotrebe i doziranje

Matična mliječ se može konzumirati u različitim oblicima, i to zasebno u svježem obliku ili pomiješana sa medom i ostalim pčelinjim proizvodima pri čemu se najčešće smrzne prije prodavanja, u liofiliziranom obliku ili kao tablete. U obliku injekcija se više ne koristi zbog alergija.

Dnevni unos za odrasle osobe u istraživanjima varira između 10 – 500 mg svježe matične mliječi, a u slučaju apiterapije se koriste za djecu doze do 100 mg, a za odrasle do 500 mg dnevno (Bogdanov, 2016).

Istraživanja na životinjama su pokazala da doze 1 do 10 mg/kg tjelesne mase dnevno uzrokuju progresivno povećanje težine, kod doza od 100 mg/kg povećanje težine je manje izraženo te kod doza od 1000 mg/kg primijećeno je smanjenje težine u odnosu na kontrolnu grupu. Toksični učinak kod viših doza matične mliječi je abnormalna morfologija moždanog tkiva životinja. Na miševima je pokazano kako je doza od 50 g/kg toksična. Kod ljudi je doza

sigurna za uporabu, ako se u obzir uzme terapijski indeks (odnos minimalne toksične prema srednjoj efektivnoj koncentraciji) od 500, 2 mg/kg tjelesne mase, no i pri porastu unosa matične mliječi do 750 mg dnevno, terapeutski učinak je prihvatljiv i iznosi 100 (Bogdanov, 2016).

Antimikrobna aktivnost

Pokazano je kako peptidi matični mliječi, i to ponajviše protein mase 5,5 kDa rojalizin i 10-HDA pokazuju antimikrobnu aktivnost (Bărnuţiu i sur., 2011; Oršolić, 2013). Peptidi matične mliječi pokazuju potpunu inhibiciju rasta bakterija *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella typhimurium* no samo u vrlo visokim koncentracijama (≥200 g/ mL). S druge strane, antimikrobni učinak 10-HDA varira ovisno o patogenosti mikroorganizama. Minimalna doza inhibicije 10-HDA je za *Escherichia coli* 0,625 mg/mL, *Bacillus subtilis* 1,25 mg/mL, *Staphylococcus aureus* 2,5 mg/mL (Bărnuţiu i sur., 2011).

Učinak na starenje

Starenje je kompleksan proces na koji utječu brojni čimbenici, a očituje se u smanjenju stanične proliferacije i obnove tkiva te postupnoga gubljenja funkcije. Pokazano je kako matična mliječ ima mitogeni učinak, odnosno potiče proliferaciju na staničnoj liniji ljudskih monocita te se smatra kako sadrži i čimbenike rasta ili hormone koji pospješuju stanični rast. Na miševima je pokazana i redukcija oksidativnih oštećenja čime se smatra da matična mliječ može produžiti životni vijek s obzirom da jedna od teorija starenja smatra nakupljanje povećane razine oksidativnih oštećenja jezgrine DNA razlogom starenja. Smatra se da se mehanizam djelovanja matične mliječi ne temelji na skupljanju slobodnih radikala već na obuzdavanju oksidativnog oštećenja tkiva, najvjerojatnije zbog ublažavanja kroničnih upala. Kolagen je predominantni vlaknasti protein izvanstaničnoga matriksa i glavni protein vezivnoga tkiva u ljudskom tijelu, a starenjem njegov sadržaj u organizmu opada. Potvrđeno je da su 10-HDA i HDAA farmakološki aktivne sastavnice matične mliječi u proizvodnji kolagena, koje u prisutnosti askorbinske kiseline potiču stvaranje transformirajućega čimbenika rasta koji povećava proizvodnju kolagena, ovisno o dozi (Oršolić, 2013).

Učinak na moždane stanice

Matična mliječ olakšava diferencijaciju svih tipova moždanih stanica (neurona, astrocita i oligodendrocita). 10-HDA djeluje na neurogenezu neuralnih progenitorskih matičnih stanica *in vitro* te povećava proizvodnju neurona, a smanjuje proizvodnju astrocita (Oršolić, 2013).

Učinak na dijabetes

Potvrđeno je da matična mliječ može potaknuti usmjeravanje preadipocita u adipocite, kao posljedicu adipogenih signala sadržanih u matičnoj mliječi. Uz to, primijećeno je kako matična mliječ potiče regeneraciju stanica gušterače što je uz očuvanje razine inzulina jedan od glavnih čimbenika za pad razine šećera u krvi. Istraživanje na štakorima za dijabetes tipa 2 pokazalo je kako bi dugotrajna konzumacija matične mliječi mogla biti efikasna u sprječavanju razvoja inzulinske otpornosti (Oršolić, 2013).

Protutumorski učinak

Za protumorski učinak matične mliječi odgovornom se smatra 10-HDA te zasićene dikarboksilne kiseline (sukcinska, glutarna, adipinska, pimelinska, suberinska, azelainska, sebacinska kiselina). Taj učinak se očituje kroz poticanje formiranja T limfocita odgovornih za imunološki odgovor protiv virusa i tumorskih stanica. Pokazano je i kako je matična mliječ učinkovita samo kod spororastućih, dok nije pokazana ta učinkovitost kod brzorastućih tumora (Oršolić, 2013).

Antioksidativni učinak

Antioksidativni učinak matične mliječi rezultat je aktivnosti mnogih komponenti, uključujući enzime, fenolne komponente te 10-HDA. Matična mliječ ima ulogu u procesu oksidativnog oštećenja, i to inhibicijom lipidne peroksidacije. Uzrok peroksidaciji lipida te oksidaciji DNA i proteina su reaktivne vrste kisika, poznatije kao ROS, nastali i zbog toksičnoga djelovanja nekih spojeva, kao primjerice tetraklormetana, kadmija i paracetamola. Matična mliječ može ublažiti toksičnost navedenih spojeva na jetrene stanice, kao i njihovu genotoksičnost i nefrotoksičnost (Oršolić, 2013).

Antialergijski učinak

Antialergijski učinak potvrđen je na miševima, a taj učinak se pripisuje glikoproteinu, komponenti skupine glavnih proteina matične mliječi poznatim pod nazivom MRJP3 koji inhibira proizvodnju interleukina 4 u stimuliranim stanicama slezene miševa imuniziranih ovalbuminom (Oršolić, 2013).

Učinak na kardiovaskularni sustav

Smatra se da primjena hidrolizirane matične mliječi smanjuje visoku razinu kolesterola, te u konačnici poboljšava homeostazu organizma. Unos matične mliječi kao dodatka prehrani smanjuje ukupnu razinu kolesterola i lipoproteina niske gustoće. To se postiže preko smanjenja lipoproteina vrlo male gustoće koji je uključen u progresiju ateroskleroze, te uz lipoprotein niske gustoće, predstavlja pokazatelja progresije bolesti (Oršolić, 2013). Zbog acetilkolina i niacina koji imaju svojstvo širenja krvnih žila preporučuje se osobama s povišenim krvnim tlakom, kao i osobama s trombozom i genetskom predispozicijom za trombozu (Lalić, 2013).

Učinak na reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis (RA), kroničnu upalnu bolest nepoznate etiologije, karakterizira hiperplazija i kronična upala sinovijalne membrane koja zalazi duboko u zglobne hrskavice i kosti. Na temelju istraživanja, 10-HDA ima dvojni inhibicijski učinak na aktivnost metaloproteinaza matriksa MMP-1 i MMP-3 te na Ras-MAP-kinaza put signalizacije što sugerira da 10-HDA može imati potencijalno korisni terapeutski učinak u inhibiciji razaranja zglobova kod pacijenata s reumatoidnim artritisom (Yang i sur., 2010).

Učinak na reproduktivni sustav i estrogenski učinak

Djelovanje matične mliječi je pokazano na spolnim organima oba spola pri čemu je uočeno povećanje prokrvljenosti (čak do 75 puta), stimuliranje diobe stanice te omogućavanje njihovog normalnog funkcioniranja. Potvrđen je njen učinak na reproduktivnu sposobnost ovaca gdje je u kombinaciji s progesteronom došlo do ubrzanja ovulacije, povećanja rasta folikula te lučenja estradiola (Oršolić, 2013). Kombinacijom matične mliječi i propolisa mogu se umanjiti menstrualni bolovi. Također je pokazano kako matična mliječ može djelovati pozitivno u menopauzi zbog smanjenja neugodnog osjećaja razdražljivosti, ublažavanja depresije te smanjenja znojenja (Lalić, 2013). Oralna primjena matične mliječi kroz 9 tjedana pokazala je djelovanje na kosti te prouzročila značajne promjene u ekspresiji gena koji se odnose na formiranje izvanstaničnog matriksa kod miševa i štakora. Upravo to potvrđuje njenu učinkovitost kao dodatak prehrani te alternativnu mogućnost u prevenciji osteoporoze (Oršolić, 2013).

2.2. AUTENTIČNOST MATIČNE MLIJEČI

Ono što u velikoj mjeri obeshrabljuje pčelare za širenje svog poslovanja vezanog za proizvodnju matične mliječi je nedostatak kriterija kvalitete, kontrole autentičnosti te geografskog podrijetla. Jedan od problema je u nedostatku europskih ili međunarodnih standarda za pčelinje proizvode, osim meda. Do danas samo je nekoliko zemalja uspostavilo nacionalne standarde ili smjernice, počevši od Argentine koja je to učinila 1979. godine. Prije nekoliko godina radna skupina IHC-a pripremila je preliminarni prijedlog za standardizaciju matične mliječi na temelju informacija koje su prikupljene (Sabatini i sur., 2009). Uz to, nedavno je ISO objavila nacrt međunarodnog standarda prema kojem bi se razlikovala matična mliječ proizvedena od strane pčela hranjenih prirodnom hranom i matična mliječ koju proizvode pčele hranjene s drugim hranjivim tvarima, kao što su proteini i ugljikohidrati (Kanelis i sur., 2015).

Zbog visoke cijene samog proizvoda, matična mliječ se može krivotvoriti dodavanjem jeftinijih proizvoda, koji ne mogu biti otkriveni senzorski poput kukuruzne kaše, jogurta, bjelanjka jajeta, kondenziranog mlijeka pomiješanog sa propolisom, nezrele banane i vode. Svi krivotvoreni uzorci pokazuju neki stupanj zamućenosti u alkalnom mediju, ovisno o vrsti i postotku dodane komponente. Prema istraživanju Garcia-Amoedo i Almeida-Muradian (2007) sadržaj 10-HDA je smanjen ili u potpunosti odsutan kod krivotvorenih uzoraka, a najniže vrijednosti su kada se doda 50 % jogurta. Uzorci krivotvoreni dodatkom jogurta, bjelanjka jajeta, vode i kukuruzne kaše, u koncentracijama većim od 25 % imaju veći udio vode, manji sadržaj lipida, proteina i 10-HDA te su netopljivi u alkalnom mediju. Uzorci krivotvoreni dodatkom jogurta, bjelanjka jajeta, vode i kukuruzne kaše, u koncentraciji od 10 % imaju veći udio vode, no manji nego u slučaju većeg onečišćenja te manji sadržaj lipida, proteina i 10-HDA te su netopivi u alkalnom mediju. Uzorci krivotvoreni dodatkom kondenziranog mlijeka u koncentracijama većim od 10 % imaju veći sadržaj lipida i manji udio vode, proteina i 10-HDA.

Matična mliječ se može krivotvoriti i dodatkom mliječi za pčele radilice i trutove, kao i dodatkom meda. Ipak, dodatak mliječi za pčele radilice i trutove je manje vjerojatan s obzirom da ga količinski ima malo za skupljanje, dok je dodatak meda vjerojatniji. Dodavanje meda u matičnu mliječi dovodi do porasta sadržaja šećera te smanjenja svih ostalih komponenti. U matičnoj mliječi se mogu pronaći i ostale tvari, poput melamina i antibiotika.

Melamin se u hranu dodaje kako bi se prividno povećaj sadržaj bjelančevina, a povezan je s pojavom nefrotilijaze, odnosno bubrežnih kamenaca. Nedavno se pojavio i problem kontaminacije matične mliječi antibioticima, s obzirom da antibiotici prisutni u koloniji mogu kontaminirati matičnu mliječ. Postoji nekoliko radova o ostatcima antibiotika u matičnoj mliječi i uglavnom se odnose na kloramfenikol. S obzirom da antibiotici nisu dopušteni za uporabu u pčelarstvu, ne postoji maksimalna razina ostataka (MDK) u medu ili drugim pčelinjim proizvodima u Europskoj uniji (Ramadana i Al-Ghamdi, 2012).

Analitičke metode razvijene za karakterizaciju matične mliječi uključuju određivanje općih parametara kao što je sadržaj vode, šećera, lipida i proteina. Određivanje lipida pruža korisne informacije o kvaliteti na temelju prisutnosti prirodnih lipida u matičnoj mliječi. Egzogeni lipidi, zbog procesa skupljanja ili namjerno dodani mogu se lako prepoznati po analizi plinskom kromatografijom uporabom odgovarajućih standarda. Oligosaharidi prisutni u vrlo malim koncentracijama korisni su za identificiranje karakterističnog uzorka, koji se može usporediti s onim od meda te u nekim slučajevima indikativno odrediti izvornost proizvoda (Bărnuţiu i sur., 2011).

Osim o dodatku tvari, kvaliteta matične mliječi ovisi i o uvjetima i dužini skladištenja s obzirom da dolazi do promjene fizikalno–kemijskih svojstava matične mliječi. Pokazano je da su se viskoznost, boja, frakcija topljivih proteina i ugljikohidrati značajno promijenili kada je matična mliječ čuvana pri sobnoj temperaturi, a do istog nije došlo kada je skladištena na -20 °C zaštićena od svjetla tijekom sedam mjeseci (Garcia-Amoedo i Almeida-Muradian, 2007). Pokazano je i kako su fizikalna svojstva matične mliječi promijenjena 20 sati nakon vađenja ukoliko je ostavljena na sobnoj temperaturi (Bogdanov, 2016). Antinelli i sur. (2003) pokazali su smanjenje koncentracije 10-HDA za 0,4 i 0,6 % u dva uzorka matične mliječi skladištene na sobnoj temperaturi tijekom 12 mjeseci. Smatra se da do degradacije kvalitete matične mliječi tijekom skladištenja dolazi zbog Maillardovih reakcija, stalne enzimske aktivnosti te interakcije između lipida i proteinskih frakcija (Isidrov i sur., 2012; Ramadana i Al-Ghamdi, 2012). Preporuke su da se odmah nakon skupljanja treba smjestiti u tamnu posudu i čuvati na 0 - 5 °C. Pohranjena u tim uvjetima kvaliteta matične mliječi ostaje prikladna tokom pola godine, a ukoliko je zamrznuta tada se može čuvati 2 - 3 godine. Čuvanjem na temperaturi od 4 °C kvaliteta matične mliječi je odgovarajuća tijekom 7 tjedana (Bogdanov, 2016).

Za određivanje kvalitete i svježine, u obzir se uzimaju tvari kao što su furozin, superoksid dismutaza, glukoza oksidaza te 10-HDA. Sadržaj furozina, kao markera Maillardovih reakcija je vrlo nizak u svježim uzorcima matične mliječi, dok do porasta sadržaja dolazi tijekom skladištenja pri povišenoj temperaturi (Sabatini i sur., 2009). S obzirom da se nalazi isključivo u matičnoj mliječi, sadržaj 10-HDA je usvojen kao marker te se trenutno koristi za procjenu pčelinjih proizvoda koji sadrže matičnu mliječ za rutinsko testiranje autentičnosti matične mliječi (Bogdanov i Gallmann, 2008; Bărnuţiu i sur., 2011). Međutim, koncentracija ove kiseline varira u širokom rasponu ovisno o samom području proizvodnje pa je tako predložena donja granica od 1,0 % te 6,0 % kao gornja granica da bi se kontrolirao dodatak sintetičke 10-HDA kako bi se prividno povećao sadržaj te utjecalo na cijenu proizvoda (Bogdanov i Gallmann, 2008; Kanelis i sur, 2015.). Obećavajući pristup za određivanje autentičnosti proizvoda jest određivanje odnosa stabilnih izotopa elemenata C (ugljik) i N (dušik). S obzirom na visoku cijenu matične mliječi proizvedene u azijskim zemljama poput Kine, Koreje, Tajvana i Japana na svjetskom tržištu određivanje zemljopisnog podrijetla je važno pitanje u kontroli kvalitete matične mliječi, a jedan od načina jest mikroskopska analiza sedimenta matične mliječi u skladu s temeljnim načelima melisopalinološke analize (Bogdanov i Gallmann, 2008).

2.3. METODE ODREĐIVANJA (2*E*)-10-HIDROKSIDEC-2-ENSKE KISELINE U MATIČNOJ MLIJEČI

Zbog sve većeg znanstvenog i gospodarskog interesa prema ovom proizvodu, potrebne su pouzdane i brze analitičke metode za provjeru kvalitete i autentičnosti matične mliječi te proizvoda na bazi matične mliječi (Ferioli i sur., 2007). U literaturi dosad su objavljene analitičke metode razvijene korištenjem različitih tehnika poput visokotlačne tekućinske kromatografije (Zhou i sur., 2007a; Ferioli i sur., 2007; Kim i Lee, 2010), plinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (Isidrov i sur., 2012), kapilarne elektroforeze (Ferioli i sur., 2007; Muñoz i sur., 2011) te tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (Zhou i sur., 2007b).

2.3.1. Kromatografske metode

Za određivanje 10-HDA u matičnoj mliječi mogu se koristiti i plinska i tekućinska kromatografija (Zhou i sur., 2007a; Zhou i sur., 2007b; Kim i Lee, 2010; Isidrov i sur., 2012).

Za određivanje 10-HDA jedna od mogućnosti je plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Prema Isidrovu i sur., (2012) izolacija 10-HDA iz matične mliječi je provedena koristeći tehniku mikroekstrakcije na čvrstoj fazi HS-SPME, kao i uzastopnu ekstrakciju matične mliječi otapalima različitog polariteta, u ovom slučaju korišteni su dietil-eter i metanol. Uzorak je ekstrahiran i filtriran te pripremljen na način da bi nastali trimetilsilil derivati. Uređaj na kojem je analiza rađena sadrži elektronički mjerač protoka te „split-splitless" injektor, odnosno injektor za djelomično unošenje uzorka. Plin nosioc je helij pri konstantnom protoku od 1 mL/min. Temperatura injektora je iznosila 250 °C, temperatura kolone iznosila je 50 do 300 °C uz povećanje od 5 °C/min, a temperatura dektora iznosila je 270 °C. Detekcija je provedena pomoću detektora selektivnog na mase. Za identifikaciju korišteni su spektri masa i parametri zadržavanja uspoređeni s literaturnim vrijednostima.

Za određivanje 10-HDA u matičnoj mliječi, može se koristiti i visokotlačna tekućinska kromatografija. Prema Zhou i sur. (2007a, 2007b) korišteni su uzorci matične mliječi u viskoznom obliku te u obliku liofiliziranog praha. Uzorci su homogenizirani i u potpunosti otopljeni u HCl-u i etanolu uz pomoć ultrazvuka, a prije same analize filtrirani. Za analizu

korištena je optimirana HPLC metoda obrnutih faza, pri čemu je kao mobilna faza korištena metanol:voda:fosforna kiselina (50:50:0.3, v/v/v) kako bi se postigao pH 2,5 zbog postizanja dobrog odjeljivanja pikova. Kao interni standard korišten je metil-4-hidroksibenzoat, a dobiveni su potpuno odijeljeni pikovi za interni standard i 10-HDA u uzorcima. U uređaj je injektirano 5 µL uzorka, a odjeljivanje je postignuto izokratnim eluiranjem uz protok od 0,8 mL/min. Detekcija 10-HDA izvršena je pri valnoj duljini od 210 nm. Prema Kim i Lee (2010.) uzorci su kupljeni od lokalnih proizvođača koji su dostavljeni zajedno s ledom te skladišteni na -4 °C do analize. Odvagani su te otopljeni u otapalu metanol:voda (50:50, v/v) a potom u potpunosti otopljeni uz pomoć ultrazvuka. Prije provedbe same analize otopine uzoraka su fitrirane. Kao mobilna faza je i u ovom slučaju korištena smjesa otapala metanol:voda:fosforna kiselina (50:50:2,7, v/v/v), a kao interni standard metil-4-hidroksibenzoat. U uređaj je injektirano 3 µL uzorka, a odjeljivanje je postignuto izokratnim eluiranjem uz protok od 1 mL/min. Detekcija 10-HDA izvršena je pri valnoj duljini od 215 nm, a snimanje spektra u intervalu od 200 nm do 400 nm. Prema Ferioli i sur. (2007) uzorci su čuvani u tamnim posudama ili udaljeni od svjetla na 4 °C odmah nakon skupljanja. Uzorci su izvagani te su nakon dodavanja deionizirane vode, tretirani u ultrazvučnoj kupelji dok se matična mliječ nije u potpunosti otopila. Uzorci su potom razrijeđeni, a analiza je provedena na supernatantu nakon centrifugiranja. Kao mobilna faza je i u ovom slučaju korištena metanol:voda (65:35, v/v) uz fosfornu kiselinu kako bi se postigao pH 2,5. U uređaj je injektirano 20 µL uzorka, a odjeljivanje je postignuto izokratnim eluiranjem uz protok od 1 mL/min. Detekcija 10-HDA izvršena je pri valnoj duljini od 210 nm, a snimanje spektra u intervalu od 195 nm do 400 nm.

Zhou i sur. (2007b) su za određivanje 10-HDA u uzorcima matične mliječi koristili tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC). Uzorci su pripremljeni na isti način kao kod Zhou i sur. (2007a) za HPLC analizu. Kao mobilna faza je korištena smjesa otapala metanol:voda:fosforna kiselina (50:50:0.3, v/v/v), a kao interni standard metil-4-hidroksibenzoat. U uređaj je injektirano 3 µL, a odjeljivanje je postignuto eluiranjem uz protok od 0,5 mL/min. Detekcija 10-HDA izvršena je pri valnoj duljini od 210 nm.

2.3.2. Kapilarna elektroforeza

Prema Ferioli i sur. (2007) uzorci su pripremljeni na isti način kao kod Ferioli i sur. (2007) za HPLC analizu. Elektroforetske analize provedene su pri 27 kV, tokom 5 minuta na 35 °C dok je jakost struje bila u rasponu od 110 do 120 μA. Kao pufer korišten je natrijev tetraborat (pH = 9,42). Detekcija je provedena na 214 nm, a 10-HDA je identificirana pomoću standardne otopine i usporedbom vremena putovanja, a kvantifikacija u različitim uzorcima se postigla pomoću kalibracijske krivulje. Muñoz i sur. (2011) u svom istraživanju uzorke su smrznuli na -40 °C i zaštitili od svjetla do analize. Uzorci su zatim liofilizirani, a potom otopljeni u etanolu uz pomoć ultrazvuka. Uzorci su prije analize filtrirani te čuvani na 4 °C tijekom analize. Standardni uvjeti za odvajanje 10-HDA uključuju 20 s na 15 kV za elektrokinetička injektiranja i 20 kV za elektroforezu, pri konstantnoj sobnoj temperaturi. Detekcija je provedena na 214 nm, a kvantifikacija 10-HDA je ostvarena pomoću kalibracijskih krivulja koje su pokrivale raspon od 20 do 300 ppm.

2.3.3. Prednosti LC u odnosu na druge tehnike

Plinska kromatografija omogućuje simultano određivanje 10-HDA i svih glavnih masnih kiselina, ali to je dugotrajno, zahtijeva ekstrakciju lipidne frakcije i uzastopnu derivatizaciju masnih kiselina, odnosno prevođenje masnih kiselina u hlapljiviji oblik, a s obzirom da prilikom derivatizacije dolazi do gubitka količine analita, tekućinska kromatografija je prikladnija metoda (Ferioli i sur., 2007; Kim i Lee, 2010).

Kapilarna elektroforeza je obećavajuća analitička tehnika koja se u posljednjih nekoliko godina opsežno istražuje. Glavne prednosti kapilarne elektroforeze su dobar učinak separacije, jednostavnost, kratko vrijeme analize, mala količina uzorka potrebnog za analizu, manji volumen mobilne faze te mogućnost rada s vodenim mobilnim fazama što omogućuje smanjenje laboratorijskih troškova s obzirom na kupnju otapala i njihovo odlaganje u okolišu. No unatoč svim prednostima, ima manju osjetljivost i reproducibilnost u usporedbi s tekućinskom kromatografijom (Ferioli i sur., 2007; Muñoz i sur., 2011).

Upravo zbog navedenih razloga tekućinska kromatografija je prikladnija metoda prilikom koje ne dolazi do gubitka analita, a sama priprema uzorka i analiza su jednostavne, dobre osjetljivosti i ponovljivosti (Kim i Lee, 2010).

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti omogućuje skraćivanje vremena za analizu i do pet puta u odnosu na konvencionalni sustav pomoću čestica veličine 5 µm pakiranih u analitičkim kolonama. Korištenje UPLC omogućuje razdvajanje ciljnih analita u vrlo kratkom vremenu od 1,5 minuta, što je u odnosu na 6 min u slučaju HPLC značajno brže. Štoviše, UPLC kolona pokazuje odličnu stabilnost kao što je prikazano vrlo stabilnim vremenom zadržavanja i nepromijenjenim oblikom vrha i za 10-HDA i interni standard, nakon što je oko 100 injektiran i 10-HDA i interni standard (Zhou i sur, 2007b). Ipak, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti zahtijeva instrument koji se još uvijek ne koristi u rutinskim analizama i nije dostupan u većini laboratorija pa su stoga potrebna dodatna ulaganja (Lalić, 2013).

Stoga je visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) najprikladnija metoda s obzirom da je uređaj prisutan u većini laboratorija, a sve navedene prednosti tekućinske kromatografije se odnose i na ovu metodu.

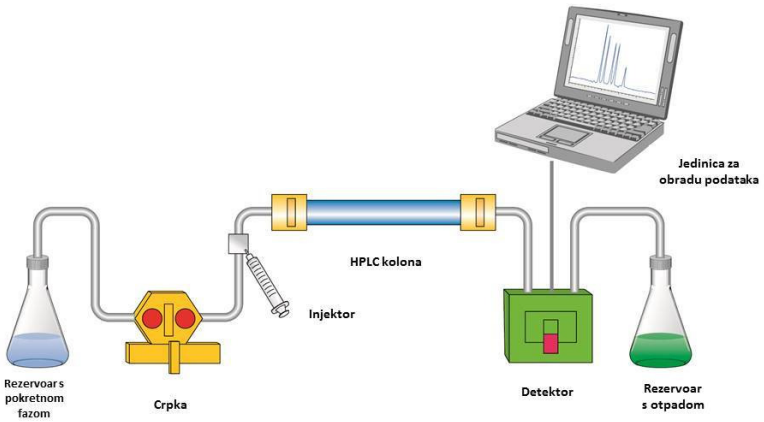
2.3.4. Visoko tlačna tekućinska kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika koja se temelji na odjeljivanju molekula zbog razlike u strukturi i/ili sastavu između dvije faze od kojih je jedna nepokretna, a druga se kreće u određenom smjeru (pokretna). Općenito govoreći, kromatografija podrazumijeva kretanje uzoraka kroz sustav preko stacionarne (nepokretne) faze. Zbog različitog afiniteta molekula u uzorku i interakcija sa nepokretnom fazom dolazi do odvajanja tih molekula, pri čemu će se komponente koje imaju jaču interakciju sa nepokretnom fazom kretati sporije. Ovisno o agregatnom stanju pokretne faze, razlikujemo plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima (Kupiec, 2004).

Visoko tlačna tekućinska kromatografija je vrsta tekućinske kromatografije koja se koristi za odvajanje i kvantificiranje komponenti u otopini. Sustavi koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji često su svrstane u jednu od pet vrsta na temelju mehanizma odjeljivanja, a to su adsorpcijska, kromatografija isključivanjem, ionsko-izmjenjivačka, razdjelna i afinitetna kromatografija. Kod adsorpcijske kromatografije odjeljivanje komponenti proizlazi iz interakcije između analita i površine krute čvrste tvari. Razdjelna kromatografija uključuje tekuću stacionarnu fazu koja se nalazi na površini čvrstog nosača ili se drži na česticama punila fizikalnom adsorpcijom. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija ima

stacionarnu fazu sa različitim površinskim ionskim nabojem od naboja uzorka, a bazira se na ionizaciji uzorka. Kromatografija isključenjem je jednostavna kao screening uzoraka po molekularnoj veličini. Stacionarna faza se sastoji od materijala s točno kontroliranom veličinom pora. Manje čestice su zadržane duže u materijalu kolone, te se eluiraju kasnije od većih čestica (Kupiec, 2004).

Kao što je prikazano na **Slici 4** HPLC uređaj sadrži rezervoar pokretne faze, crpku, injektor, kolonu, detektor i jedinicu za obradu podataka. S obzirom na veličinu čestica stacionarne faze, potrebna je visokotlačna crpka kako bi se osigurao protok pokretne faze kroz kolonu. Kromatografski proces započinje injektiranjem otopine pomoću injektora, a odvajanje komponenata se postiže kada se analit i mobilna faza kreću kroz kolonu. Detekcija komponenti vrlo je važna, a metoda koja se koristi ovisi o vrsti detektora. Odgovor detektora za svaku komponentu je prikazan na zaslonu računala i poznat je kao kromatogram. Detektor se koristi za detekciju prisutnosti spoja koji prolazi kroz te osiguravanje elektronskog signala uređaju za prikupljanje podataka. Detektori koji se koriste u HPLC analizi su detektor indeksa loma (RI), UV apsorpcijski (UV-Vis) i fluorescentni, detektor s nizom dioda te elektrokemijski. Svaki detektor ima svoje prednosti, ograničenja i vrste analita za koji je najučinkovitiji (Kupiec, 2004).



Slika 4 Shematski prikaz HPLC uređaja (Töppner i sur., 2014)

Eluiranje (ispiranje) predstavlja glavnu tehniku razdvajanja u kolonskoj kromatografiji, a podrazumijeva ispiranje prisutnih komponenti smjese kroz kolonu stalnim dodavanjem čistog otapala. Eluiranje može biti izokratno, gradijentno te stupnjevito. Izokratnim eluiranjem sastav mobilne faze ostaje stalan tijekom ispiranja, gradijentnim se sastav pokretne faze kontinuirano mijenja tijekom ispiranja, dok se stupnjevitim eluiranjem sastav pokretne faze mijenja u koracima tijekom kromatografskog postupka (Cerjan-Stefanović i sur., 1999).

Prema polarnosti pokretne i nepokretne faze, razlikujemo kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografija obrnutih faza je postupak ispiranja u kojemu je pokretna faza polarnija od nepokretne faze, dok je kromatografija normalnih faza postupak ispiranja u kojem je nepokretna faza polarnija od pokretne faze (Cerjan-Stefanović i sur., 1999). Izbor optimalne mobilne faze posebno je važan s obzirom da se zadržavanje analita i selektivnost podešava variranjem sastava mobilne faze. S druge strane, vrsta uzorka, njegova polarnost i topljivost određuju izbor stacionarne faze i vrstu kromatografske tehnike. Uz odabir faza te tehnike, važno je i podešavanje pH vrijednosti mobilne faze. Optimalna vrijednost pH je između 2 - 8,5 s obzirom da više vrijednosti pH dovode do otapanja silikagela i pucanja veza unutar strukture stacionarne faze (Lalić, 2013).

Osnovna teorija kvantifikacije uključuje mjerenje visine i površine pika. Za pikove koji su dobro odijeljeni, i visina i površina pika su proporcionalni koncentraciji. Tri različita pristupa kvantifikaciji, svaki sa svojim prednostima i ograničenjima, mogu se koristiti u kvantitativnoj analizi: vanjska (apsolutna) kalibracija, unutarnja (interna) kalibracija i normalizacija površina. Vanjska i unutarnja kalibracija najčešće se koriste kod tekućinske kromatografije dok se normalizacija površina primjenjuje rijetko. Kod vanjske kalibracije pripremaju se standardi u području koncentracija koje se očekuju u uzorcima, a za analizu uzoraka podaci kromatograma uzorka uspoređuju s podacima kalibracijske krivulje svake pojedine komponente. Kod unutarnje kalibracije jednaka količina internog standarda, komponente koja nije prisutna u uzorku, doda se u uzorke i standardne otopine. Interni standard bi trebao biti kemijski sličan komponenti koja se određuje, stabilan te da ne reagira s nekom od komponenti uzoraka, imati kraće vrijeme zadržavanja te biti dovoljno odijeljen od ostalih pikova. Kvantifikacija se postiže omjerom visine ili površine pika internog standarda i standarda promatrane komponente (Kupiec, 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj rada bio je validirati HPLC metodu, odrediti udio 10-HDA u uzorcima matične mliječi te ispitati utjecaj vrste ambalažnog materijala na udio 10-HDA u matičnoj mliječi.

3.2. MATERIJAL I METODA

Istraživanje je provedeno na uzorcima matične mliječi primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije uz primjenu apsorpcijskog detektora.

3.2.1. Uzorci

U svrhu provedbe istraživanja uzorci su prikupljeni od pčelara sa područja Osječke-baranjske županije. Oni su matičnu mliječ istovremeno skupili u bočice od tamnog stakla sa čepom zapremnine 1,5 mL i posudice od mutne plastike sa čepom zapremnine 1,5 mL. Uzorci su odmah zamrznuti te dopremljeni u zamrznutom stanju u laboratorij gdje nisu odmrznuti do analize. Za analizu su korištena četiri uzorka u staklenoj i plastičnoj ambalaži te jedan uzorak samo u staklenoj ambalaži.

3.2.2. Metoda

Ne postoji službeno propisana metoda za određivanje 10-HDA u matičnoj mliječi, a u literaturi je opisan čitav niz metoda koje primjenjuju različite tehnike određivanja, a i različite modifikacije iste tehnike. Kao polazna metoda za određivanje 10-HDA u matičnoj mliječi upotrijebljena je HPLC metoda prema Kim i Lee (2010). Kromatografski uvjeti su modificirani kako bi najbolje odgovarali primjenjenoj kromatografskoj koloni i instrumentu te je modificirana metoda validirana.

Analiza je provedena na uređaju za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (HPLC) proizvođača Shimadzu. HPLC sustav korišten za analizu sastojao se od kvarterne crpke LC 20-AD, komore za kolonu CTO 20-AC, detektora sa nizom dioda (eng. photo-diode array (PDA). detector) te autosamplera SIL-10 AF. Upravljanje sustavom provedeno je pomoću računala opremljenim specijaliziranim računalnim programom LabSolution Lite (Release 5.52). Za odjeljivanje sastojaka uzorka korištena je kolona Inertsil 5 ODS-3 (Chrompack) dimenzija 150x4,6 mm, punjena česticama veličine 5 μm.

Odjeljivanje je postignuto izokratnim eluiranjem uz protok od 1mL/min, a kao pokretna faza korištena je otopina metanol:voda (50:50, v/v) uz dodatak fosforne kiseline da bi se postigao

pH 2,5. Identifikacija 10-HDA je provedena na osnovu vremena zadržavanja i usporedbe apsorpcijskog spektra uzoraka matične mliječi sa spektrom standarda, a kvantifikacija na osnovi unutarnje (interne) kalibracije. Kao interni standard za analize korišten je standard metil-4-hidroksibenzoat (Sigma Aldrich, SAD), čistoće ≥ 99 %. Za pripremu standardnih otopina za izradu kalibracijske krivulje korišten je standard (2*E*)-10-hidroksidec-2-enske kiseline (Cayman chemical, SAD), čistoće ≥ 98 %. Za pokretnu fazu korišten je metanol HPLC čistoće (J.T.Baker, Nizozemska), demineralizirana voda te fosforna kiselina, 85 - 90 %, HPLC čistoća (Fluka, SAD).

Temeljem očekivanih raspona koncentracija 10-HDA u uzorcima, napravljen je niz od 6 otopina 10-HDA koncentracija 0,48608; 0,97216; 4,9392; 9,8; 19,6; 78,4 μg/mL. Za pripremu internog standarda odvagano je 0,0050 g standarda metil-4-hidroksibenzoata u odmjernu tikvicu od 50 mL. Tikvica je potom nadopunjena do oznake otopinom vode i metanola (50:50, v/v). Nakon toga tikvica je promiješana na vorteksu kroz minutu te je otopina fitrirana kroz 0,22 μm membranski filter od najlona. U vialu za autosampler mikropipetom je dodano 750 μL otopine standarda i 250 μL internog standarda.

Odjeljivanje je provedeno u koloni grijanoj na 35 °C. Detekcija 10-HDA izvršena je pri valnoj duljini od 215 nm, a snimanje spektra u rasponu valnih duljina od 190 nm do 400 nm.

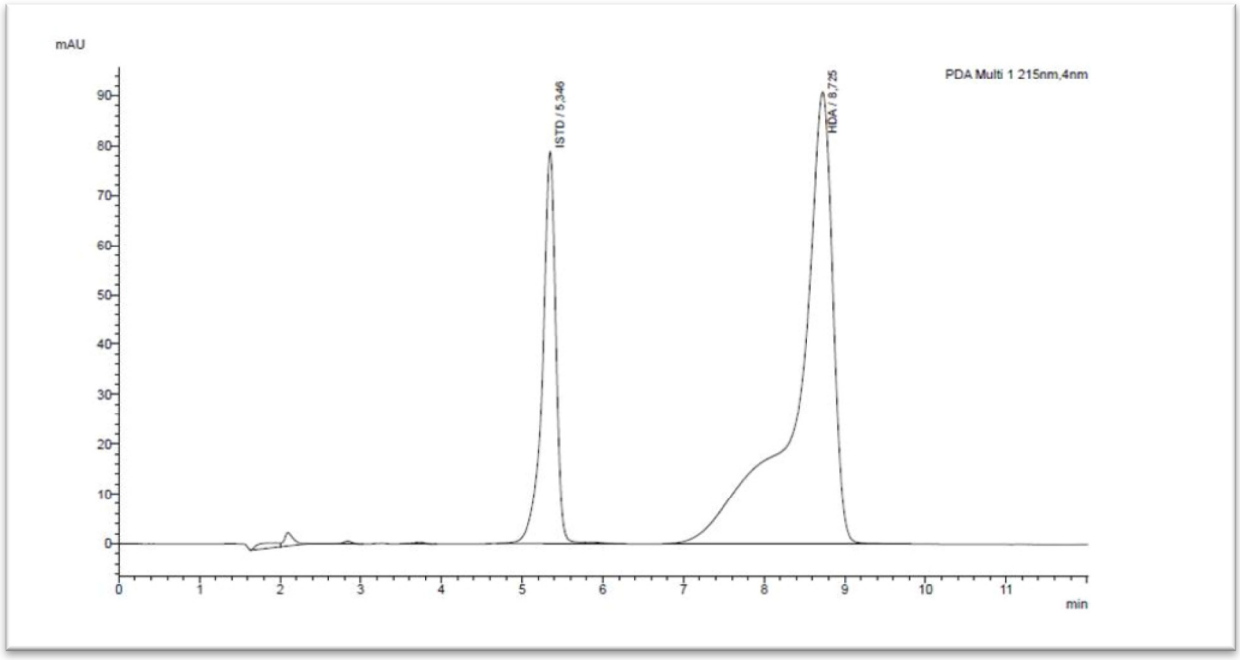
U uređaj je injektirano 10 μL uzorka. Analize uzoraka provedene su u dva ponavljanja, a iz svake pripremljene otopine izvršena su dva injektiranja. Rezultati udjela 10-HDA u analiziranim uzorcima izraženi su u %.

U svrhu validacije metode određeni su: linearnost, preciznost (ponovljivost pripreme otopine i ponovljivost mjerenja) i točnost. Linearnost metode provjerena je u rasponu koncentracija od 0,48608 do 78,4 μg/mL. Standard je za osnovnu otopinu 10-HDA odvagan na analitičkoj vagi s preciznošću ±0,0001 g, a preostale otopine dobivene su razrjeđivanjem. S ciljem određivanja ponovljivosti mjerenja, otopina istog uzorka je injektirana pet puta. Za ispitivanje ponovljivosti pripreme otopina, otopina istog uzorka pakiranog u staklenu ambalažu pripremljena je pet puta, pri čemu je svaka otopina injektirana dva puta. Točnost metode, izražena kao iskorištenje (%), ispitana je na način da je prvo analiziran uzorak matične mliječi pakirane u staklenu ambalažu te nakon toga provedena analiza istog uzorka s dodatkom standarda poznate koncentracije.

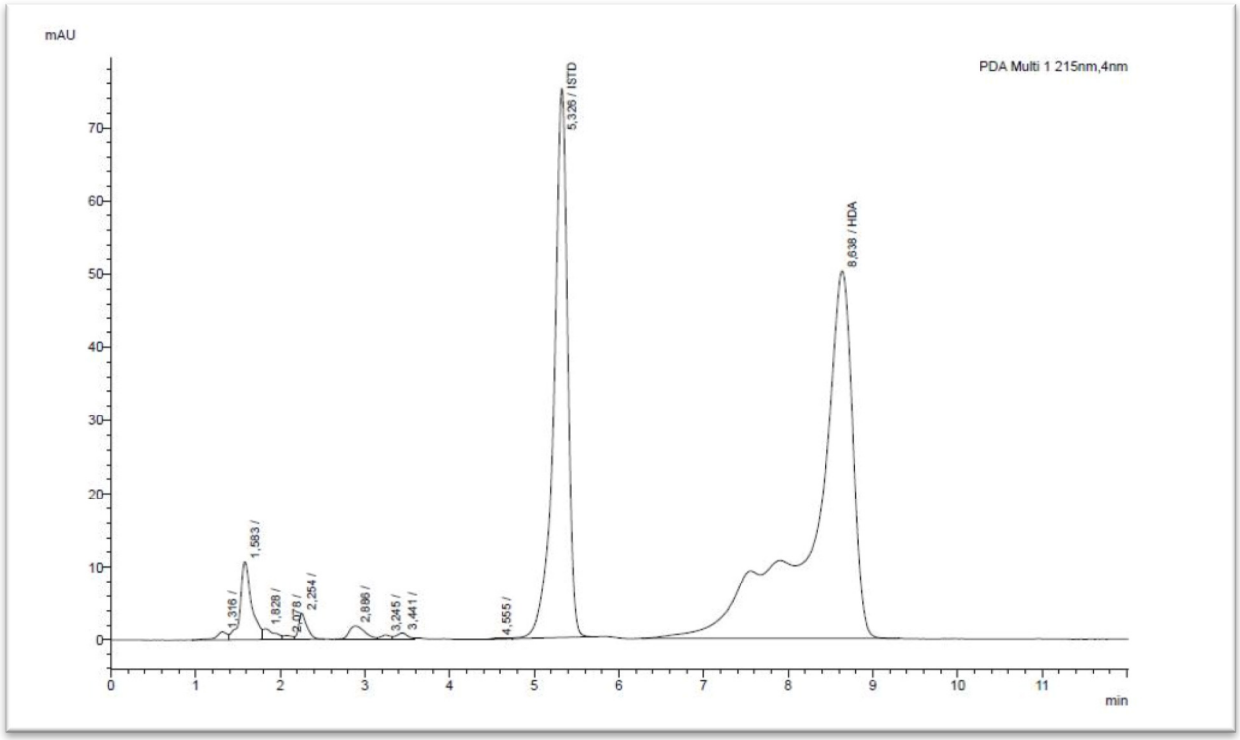
Za analizu uzoraka matične mliječi odvagano je 0,0100 g uzorka u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica je potom nadopunjena do oznake otopinom vode i metanola (50:50, v/v). Nakon toga tikvica je promiješana na mješalici kroz minutu, te je potom provedena ultrazvučna ekstrakcija kroz odgovarajući period vremena (15 - 30 minuta). Nakon ekstrakcije, uzorak je filtriran propuštanjem prvo kroz 0,45, a potom kroz 0,22 µm membranski filter od najlona.

U vialu za autosampler mikropipetom dodano je 750 µL uzorka i 250 µL internog standarda.

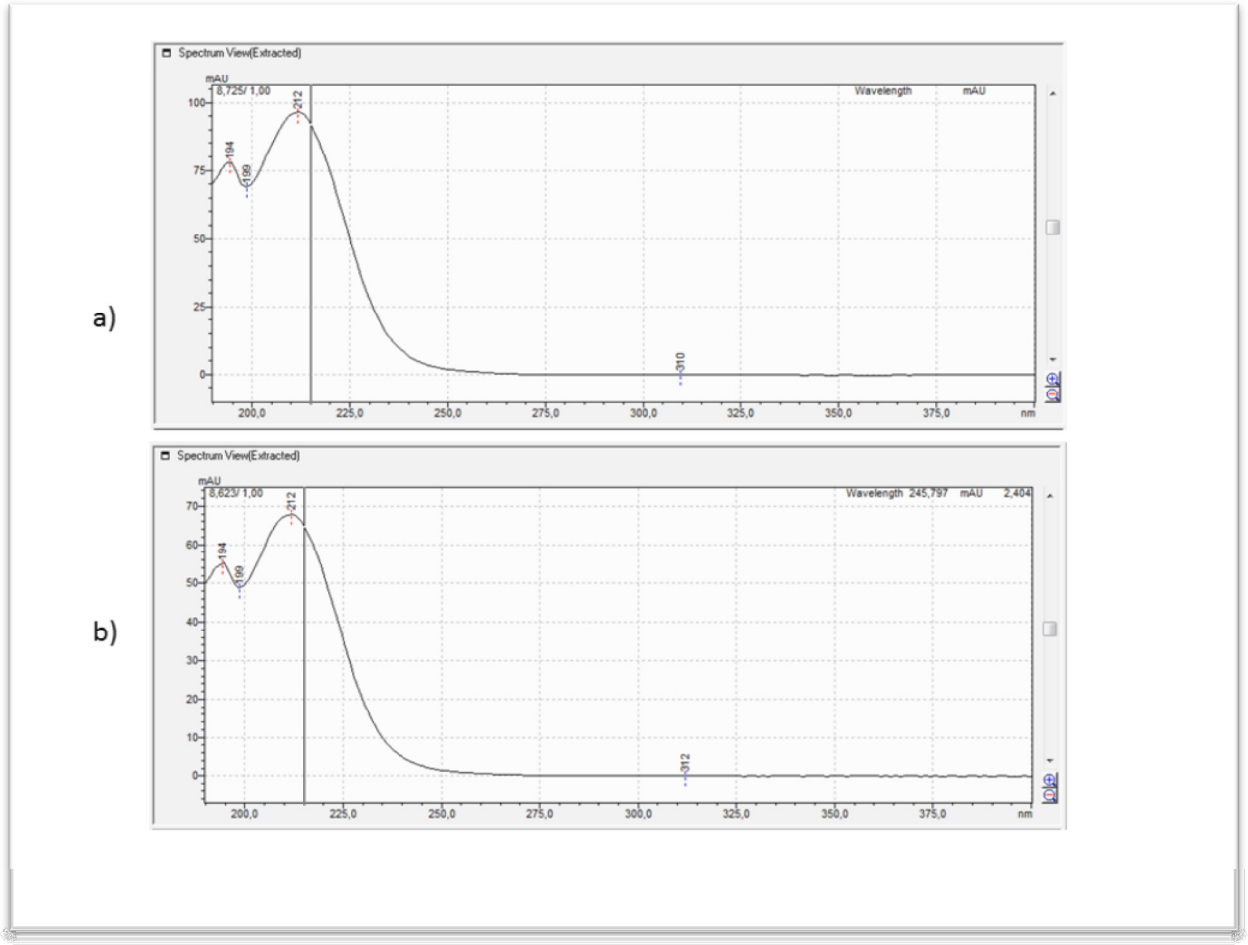
4. REZULTATI



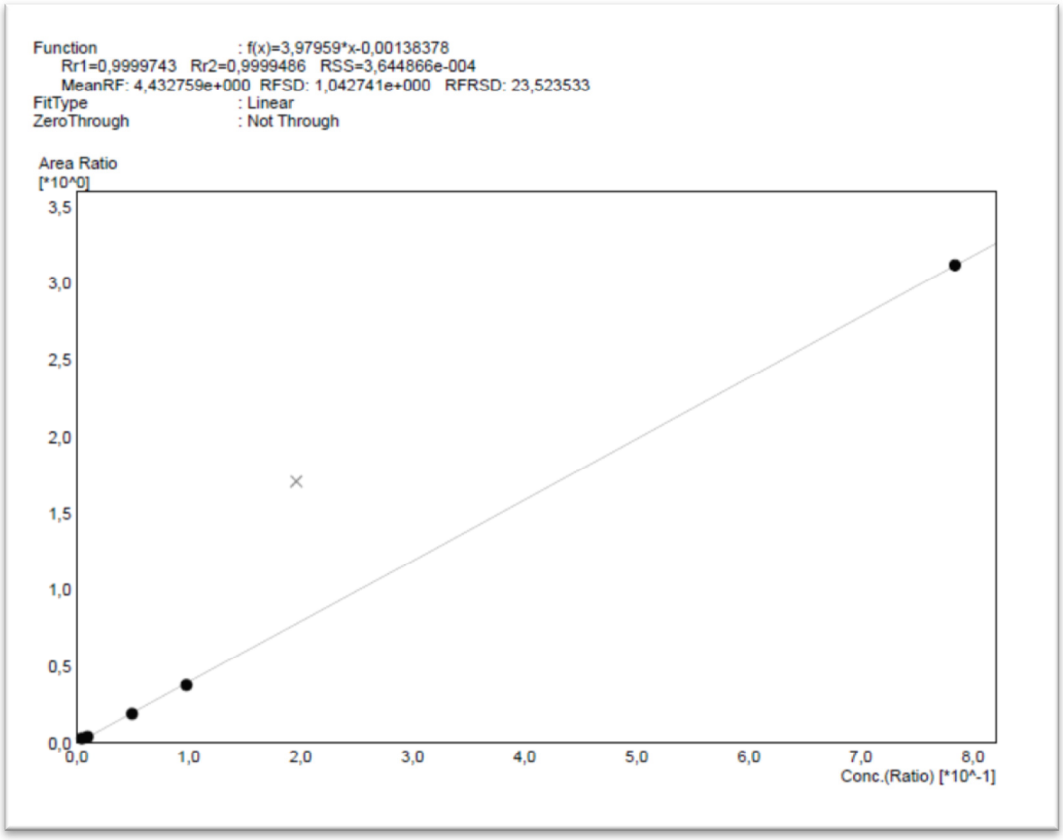
Slika 4 Kromatogram standarda 10-HDA pri 215 nm



Slika 5 Kromatogram uzorka matične mliječi pri 215 nm



Slika 6 Apsorpcijski spektar 10-HDA u standardnoj otopini (a) i uzorku matične mliječi (b)



Slika 7 Kalibracijska krivulja

Tablica 2 Ponovljivost mjerenja

Uzorak matične mliječi	Udio 10-HDA (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje, SD (%)	Relativno standardno odstupanje, RSD (%)
1	3,68	3,66	0,01	0,22
2	3,66			
3	3,67			
4	3,66			
5	3,66			

Tablica 3 Ponovljivost pripreme uzorka

Uzorak matične mliječi	Udio 10-HDA (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje, SD (%)	Relativno standardno odstupanje, RSD (%)
1	3,68	3,64	0,24	6,56
	3,66			
2	3,90			
	3,90			
3	3,86			
	3,86			
4	3,42			
	3,38			
5	3,36			
	3,35			

Tablica 4 Točnost ispitivane metode

Otopina	Dodana količina standarda 10-HDA (µg/mL)	Očekivane vrijednosti (µg/mL)	Očitane vrijednosti (µg/mL)	Iskorištenje (%)
Uzorak	0		20,643	
Uzorak+std1 (1:1)	13,270	17,1813	16,387	95
Uzorak+std2 (1:1)	6,860	13,7513	13,285	97
Uzorak+std3 (1:1)	1,372	11,0075	10,897	99

Tablica 5 Vrijednosti pojedinačnih mjerenja, srednje vrijednosti, standardnog odstupanja i relativnog standardnog odstupanja 10-HDA (%) u uzorcima matične mliječi

Oznaka uzorka	Ambalaža	Udio 10-HDA (%)	Srednja vrijednost (%)	Standardno odstupanje, SD (%)	Relativno standardno odstupanje, RSD (%)
1	STAKLO	2,95	2,98	0,05	1,66
		2,92			
		3,02			
		3,02			
	PLASTIKA	2,08	2,06	0,02	0,83
		2,07			
		2,06			
		2,05			
2	STAKLO	1,56	1,56	0,01	0,48
		1,55			
		1,57			
		1,55			
	PLASTIKA	1,57	1,56	0,01	0,44
		1,56			
		1,56			
		1,56			
3	STAKLO	1,80	1,80	0,01	0,55
		1,80			
		1,80			
		1,81			
	PLASTIKA	1,77	1,78	0,01	0,48
		1,79			
		1,78			
		1,79			
4	STAKLO	1,66	1,65	0,01	0,83
		1,67			
		1,64			
		1,65			
5	STAKLO	3,68	3,78	0,13	3,46
		3,66			
		3,90			
		3,90			
	PLASTIKA	3,63	3,61	0,02	0,43
		3,62			
		3,60			
		3,60			

5. RASPRAVA

Prema zadatku rada validirana je HPLC metoda, određen je udio 10-HDA u uzorcima matične mliječi te ispitan utjecaj vrste ambalažnog materijala na udio 10-HDA u matičnoj mliječi.

Nakon odjeljivanja komponenti uzorka matične mliječi, provedena je identifikacija komponente 10-HDA. Identifikacija 10-HDA provedena je na osnovi usporedbe vremena zadržavanja i apsorpcijskog spektra sa standardom 10-HDA. Kromatogram standarda prikazan je na **Slici 4**, dok je kromatogram uzorka matične mliječi prikazan na **Slici 5.** Usporedbom vremena zadržavanja može se potvrditi da je komponenta sa vremenom zadržavanja 8,6 minuta 10-HDA. Da bi nedvojbeno dokazali da se radi o 10-HDA uspoređeni su apsorpcijski spektri standarda 10-HDA i komponente u uzorku matične mliječi sa vremenom zadržavanja 8,6 minuta. Apsorpcijski spektri 10-HDA u standardnoj otopini i uzorku matične mliječi prikazani su na **Slici 6**, te se na osnovu izgleda spektara može nedvojbeno potvrditi da je komponenta sa vremenom zadržavanja 8,6 minuta komponenta od interesa, odnosno 10-HDA.

Validacija je provedena ispitivanjem odabranih izvedbenih značajki metode: linearnosti, preciznosti i točnosti. Injektiranjem pripremljenih otopina standarda 10-HDA u rasponu koncentracija od 0,48608 do 78,4 μg/mL dobiveni su kromatogrami temeljem kojih se matematički linearnom regresijom dobila jednadžba pravca, te izračunat koeficijent korelacije (r) čija je vrijednost prikazana na **Slici 7**. Iz kalibracijske krivulje uočava se kako je metoda linearna u cijelom području ispitivanih koncentracija, a to potvrđuje koeficijent korelacije koji za pravac iznosi 0,999. Višestrukim injektiranjem iste otopine uzorka ispitana je ponovljivost mjerenja, a dobivene vrijednosti prikazane su u **Tablici 2**. Relativno standardno odstupanje iznosilo je 0,22 %. Prema preporukama za kriterije izvedbenih značajki kromatografskih metoda (CDER, 1994), prihvatljivo relativno standardno odstupanje ponovljivosti injektiranja iznosi < 1 % te se može zaključiti da je primijenjena metoda precizna. Ponovljivost pripreme otopina ispitana je pripremom pet otopina istog uzorka, te injektiranjem svake pripremljene otopine dva puta. Rezultati ponovljivosti pripreme otopina prikazani su u **Tablici 3**, a relativno standardno odstupanje iznosilo je 6,56 %. Ukoliko nema vrijednosti s kojima se mogu usporediti, teoretski se relativne preciznosti mogu izračunati iz Horwitz jednadžbe ili Horrat-ovih vrijednosti. Uz to, AOAC *Peer Verified Program* predlaže vlastite razine prihvatljivosti % RSD, kao funkcije koncentracije analita (Taverniers i sur., 2004). Točnost je ispitana obogaćivanjem uzorka matične mliječi otopinama standarda

poznate koncentracije u omjeru 1:1, pri čemu su dobivene vrijednosti iskorištenja od 95, 97 i 99 %, što je prikazano u **Tablici 4**. Prema navedenim parametrima validacije metode možemo zaključiti da je primijenjena metoda prikladna namjeni.

Analizirano je pet uzoraka matične mliječi, od čega su četiri pakirana u staklenu i plastičnu ambalažu odmah po vađenju matične mliječi, dok je jedan uzorak dostavljen samo u staklenoj ambalaži.

Rezultati udjela 10-HDA u analiziranim uzorcima matične mliječi prikazani su u **Tablici 5**. Udio 10-HDA u ovim uzorcima kretao se u rasponu od 1,56 % u uzorku 2 do 3,78 % u uzorku 5. Prema tome, svi uzorci zadovoljavaju preporuke međunarodnih institucija ISO i IHC od > 1,4 % te preporuke Kanelisa i sur. (2015.) od 1 - 6 %. Na osnovu dobivenih rezultata, svi uzorci analizirani u ovom radu su svježi i autentični. Rezultati udjela 10-HDA u matičnoj mliječi se podudaraju i s rezultatima Ferioli i sur. (2007.) koji su pokazali kako su uzorci europske te talijanske matične mliječi kao izdvojene sadržavali od 0,8 do 3,2 % 10-HDA. Genç i Aslan (1999.) su odredili koncentraciju 10-HDA u turskim uzorcima matične mliječi od 0,33 do 2,54 %, dok su Mureşan i sur. (2016) u rumunjskim uzorcima dobili vrijednosti 1,35 - 2,03 %. Kanelis i sur. (2015) su izmjerili koncentraciju 10-HDA u grčkim uzorcima matične mliječi od 0,8 do 6,5 %, sa srednjom vrijednošću od 2,32 %. Određena je i količina 10-HDA od 1,85 do 2,18 % u uzorcima matične mliječi u SAD-u (Kim i Lee, 2010). Zhou i sur. (2007a) su izmjerili koncentraciju 10-HDA u kineskoj matičnoj mliječi od 1,26 do 2,25 %. Unatoč tome što prema Oršolić (2013) kineska matična mliječ ima veći udio 10-HDA, prema našim rezultatima, a i rezultatima drugih istraživanja, vrijednosti 10-HDA europskih matičnih mliječi su jednake ili više onim vrijednostima izmjerenim u istraživanju Zhou i sur. (2007a) za matičnu mliječ iz Kine. S obzirom da nisu dostupni podaci o količini 10-HDA u matičnoj mliječi sa područja Republike Hrvatske, podaci dobiveni u ovom istraživanju mogu se koristiti kao preliminarni podaci o udjelu 10-HDA u hrvatskoj matičnoj mliječi. Daljnja istraživanja trebala bi uključiti veći broj uzoraka i sa drugih područja Republike Hrvatske kako bi se utvrdile granice i eventualne specifičnosti obzirom na geografsko područje.

Vrijeme prikupljanja matične mliječi nakon presađivanja je vrlo važno za udio 10-HDA. Većina proizvođača matičnu mliječ vadi tri dana (72 h) nakon presađivanja, jer u tom trenutku količina matične mliječi dostiže svoj vrhunac (Zheng i sur., 2011). Prema istraživanju Zheng i sur. (2011), udio 10-HDA i proteina je najveći nakon 24 sata, dok je nakon 48 i 72 sata

bio sličan. U dehidriranim uzorcima matične mliječi nakon 24, 48 i 72 sata, udio 10-HDA je bio konstantan što ukazuje na djelovanje razrjeđenja (dodatak vode, dodavanje želea s višim sadržajem vode, ili pasivnu apsorpciju vodene pare kroz higroskopni efekt). Neka istraživanja su utvrdila da je udio 10-HDA nakon 24 sata bio znatno niži od onog vađenog nakon 48 sati, ali veći od onog nakon 72 sata, što ukazuje na moguće geografske i genetske razlike između pčelinjih populacija za tu varijablu. U svakom slučaju, pokazano je da vrijeme vađenja utječe na sastav matične mliječi te da ukoliko se skuplja ranije od 72 sata nakon presađivanja neki od glavnih sastojaka su izvan raspona navedenog u preporukama međunarodnih institucija (Zheng i sur., 2011) te se ipak preporuča matičnu mliječ vaditi 72 sata nakon presađivanja. I u ovom istraživanju potvrđen je utjecaj vremena vađenja matične mliječi na udio 10-HDA. Naime, prema informaciji pčelara, uzorak 1, pakiran u plastičnu i staklenu ambalažu izvađen je s odmakom od nekoliko dana i kod tog uzorka uočena je primjetnija razlika u udjelu 10-HDA (**Tablica 5**).

Matična mliječ često nije homogena s obzirom na prisutnost neotopljenih granula različitih veličina (Ramadana i Ahmed Al-Ghamdi, 2012), pa je potrebno provesti prethodnu obradu uzorka. U ovom istraživanju, korištena je ultrazvučna ekstrakcija kao jednostavna i brza metoda za bolje otapanje matične mliječi. Pokazano je kako različite vrste matične mliječi imaju različito vrijeme otapanja, i to do sat vremena pa upravo zbog toga nije lako standardizirati samo vrijeme provedbe ekstrakcije. U ovom istraživanju, ultrazvučna ekstrakcija je provedena dok uzorak nije bio otopljen, za što je bilo potrebno 15 – 30 minuta, ovisno o uzorku. Tijekom tog perioda, uzorak se sonificira neprekidno uz povremeno mućkanje sve dok se potpuno ne otopi.

U ovom radu ispitan je utjecaj vrste ambalažnog materijala na udio 10-HDA u svježoj matičnoj mliječi. Svježa matična mliječ se obično pakira u male, tamne i staklene bočice u veličinama od 10, 15 ili 20 grama (Krell, 1996; Bogdanov, 2016). Ponekad se uz staklene bočice, koriste i oblikovane polistirenske kutije kako bi proizvod izgledao privlačno te bio zaštićen od kratkih temperaturnih fluktuacija. Zbog cijene samog stakla, staklena ambalaža je skuplja u odnosu na plastičnu te stoga utječe na cijenu samog proizvoda (Krell, 1996). Upravo zbog toga, ispitan je utjecaj staklene i plastične ambalaže na udio 10-HDA. Dobiveni rezultati za uzorke pakirane u staklenoj i plastičnoj ambalaži su prikazani u **Tablici 5**. Iz **Tablice 5** vidljivo je da se u uzorku 1 udio 10-HDA pakiranog u staklenu i plastičnu ambalažu

razlikuje, no u ovom slučaju matična mliječ je vađena u različito vrijeme, a kako je već objašnjeno vrijeme vađenja matične mliječi ima utjecaj na koncentraciju 10-HDA. U uzorcima 2 i 3 se uočava kako nema razlike u udjelu 10-HDA u matičnoj mliječi pakiranoj u staklenoj i plastičnoj ambalaži, dok neznatna razlika postoji u uzorku 5 koja je unutar granica preciznosti dobivenih u ovom istraživanju. Na osnovi dobivenih rezultata, može se zaključiti da, ukoliko se vađenje provodi u isto vrijeme i skladišti u istim uvjetima, vrsta ambalažnog materijala ne utječe na udio 10-HDA u matičnoj mliječi.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Na osnovu rezultata analiziranih izvedbenih značajki metode možemo zaključiti da je ispitivana HPLC metoda prikladna namjeni.

- U uzorcima svježe matične mliječi utvrđen je udio 10-HDA u rasponu od 1,56 do 3,78 %.

- Prema dobivenim rezultatima analize, uzevši u obzir međunarodne preporuke, može se zaključiti da su svi uzorci iz Osječko-baranjske županije korišteni u ovom istraživanju svježi i nekrivotvoreni.

- Vrsta ambalažnog materijala ne utječe na udio 10-HDA u svježoj matičnoj mliječi ako se uzorak nakon vađenja zamrzne i skladišti u zamrzivaču.

7. LITERATURA

Antinelli JF, Zeggane S, Davico R, Rognone C, Faucon JP, Lizzani L: Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chemistry*, 80:85-89,2003.

Bărnuţiu LI, Mărghitaş L, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiş O: Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly – Review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44:67-72, 2011.

Bogdanov S: The Royal Jelly, Bee Product Science, 2016. http://www.bee-hexagon.net/ [20.05.2016.]

Cayman chemical: 10-HDA, Cayman chemical, 2016. https://www.caymanchem.com/product/10976 [15.08.2016]

CDER, Center for Drug Evaluation and Research: *Validation of Chromatographic Methods.* CMC 3.

Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Medić-Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S: Kromatografsko nazivlje. HINUS, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Hrvatsko kemijsko društvo, Zagreb, 1999.

Ferioli F, Marcazzan GL, Caboni MF: Determination of (*E*)-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly: A comparison between a new CZE method and HPLC. *Journal of Separation Science*, 30:1061-1069, 2007.

Garcia-Amoedo LH, Almeida-Muradian LB: Physcochemical composition of pure and adultered royal jelly. *Química Nova*, 30: 257-259, 2007.

Genç M, Aslan A: Determination of *trans*-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 839: 265–268, 1999.

Isidorov VA, Bakier S, Grzech I: Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 885– 886: 109– 116, 2012.

Kanelis D, Tananaki C, Liolios V, Dimou M, Goras G, Rodopoulou MA, Karazafiris E, Thrasyvoulou A: A suggestion for royal jelly specifications. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*,66:275-284,2015.

Kim J, Lee J: Quantitative analysis of trans -10-hydroxy -2 decenoic acid in royal jelly products purchased in USA by high performance liquid chromatography. *Journal of Apicultural Science*, 54:77-84, 2010.

Krell R: Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* 124, 1996.

Krmpotić A: Matična mliječ. Završni rad. *Poljoprivredni fakultet*, Osijek, 2014.

Lalić M: Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje sadržaja 10-hidroksi-2-decenske kiseline u proizvodima s matičnom mliječi. Rad za dodjelu Rektorove nagrade. *Farmaceutsko-biokemijski fakultet*, Zagreb, 2013.

Lifemartini.com: Top Four Royal Jelly Benefits, Lifemartini.com, 2016. http://www.lifemartini.com/top-four-royal-jelly-benefits/ [10.08.2016.]

Muñoz O, Decap S, Ruiz F, Arbildua J, Monasterio O: Determination of 10 –hydroxy – 2-decenoic acid in royal jelly by capillary electrophoresis. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 56:738-740, 2011.

Mureşan IC, Mărghitaş AL, Dezmirean SD, Bobiş O, Bonta V, Zacharias I, Mărgăoan R, Paşca C: Quality Parameters for commercialized Royal Jelly. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 73: 1-8, 2016.

Oršolić N: Učinkovitost biološki aktivnih sastavnica matične mliječi: analiza i standardizacija. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64:445-461, 2013.

Ramadana MF, Al-Ghamdi A: Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4:39-52, 2012.

Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB: Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(1): 1-6, 2009.

Yang XY, Yang D,Zhang W, Wang JM, Li CY,Yeb H, Lei KF, Chen XF, Shen NH, Jin LQ, Wang JG: 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: A potential medicine for RA. *Journal of Ethnopharmacology* 128:314–321, 2010.

Taverniers I, Loose M, Bockstaele E: Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23:535-552, 2004.

Töppner K, Hansen D, Herbig E: HPLC Analysis The Role of Ultrapure Water. G.I.T. Laboratory Journal 2014. http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis [01.09.2016.]

Zheng HQ, Hu FL, Dietemann V: Changes in composition of royal jelly harvested at different times: consequences for quality standards. *Apidologie*, 42(1):39-47, 2011.

Zhou J, Xue X, Li Y, Zhang J, Zhao J: Optimized Determination Method for *trans*-10-Hydroxy-2- Decenoic Acid Content in Royal Jelly by High-Performance Liquid Chromatography with an Internal Standard. *Journal of AOAC International*, 90:244-249, 2007a.

Zhou J, Zhao J, Yuan H, Meng Y, Li Y, Wu L, Xue X: Comparison of UPLC and HPLC for Determination of trans-10-Hydroxy- 2-Decenoic Acid Content in Royal Jelly by Ultrasound-Assisted Extraction with Internal Standard. *Chromatographia*, 66(3): 185-190, 2007b.