

# Određivanje sadržaja vitamina E u hrani za nesilice

---

**Dončić, Renata**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:078569>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Renata Dončić**

**Određivanje sadržaja vitamina E u hrani za nesilice**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Renata Dončić**

**Određivanje sadržaja vitamina E u hrani za nesilice**

**Diplomski rad**

**Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović**

**Neposredni voditelj: dr. sc. Manuela Grčević**

**Osijek, 2021.**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

## ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA E U HRANI ZA NESILICE

**Renata Dončić**

**Rad je izrađen na** Odjelu za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentorica:** doc. dr. sc. Olivera Galović

**Neposredna voditeljica:** dr.sc. Manuela Grčević

### **Sažetak**

Vitamin E je organska tvar topiva u mastima. Vrlo je važan za zdravlje ljudi, a budući da ga ljudsko tijelo ne može samostalno proizvoditi, potrebno ga je unositi hranom ili dodacima prehrani. Također je važan dodatak prehrani u hrani za kokoši nesilice zbog održavanja fizioloških funkcija i proizvodnje jaja te se na taj način povećava unos vitamina E i u ljudsko tijelo. Cilj istraživanja bio je utvrditi sadržaj vitamina E u hrani za kokoši nesilice i hrani za kokoši obogaćenu vitaminom E i raznim uljima. Korištene su tri različite metode: izravna ekstrakcija metanolom, izravna ekstrakcija ultrazvukom i ekstrakcija s prethodnom saponifikacijom. Nakon ekstrakcije uzorci su analizirani pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Koncentracija vitamina E određena je u uzorcima hrane za kokoši dostupne na tržištu, u uzorcima s dodanim uljima, s dodatkom drugih nutricina (selena i luteina) i u hrani s dodatkom vitamina E i drugih nutricina. Najveća koncentracija vitamina E pronađena je u uzorcima s dodatkom vitamina E i drugih nutricina (725,940 mg/kg hrane), a najniža koncentracija vitamina E u uzorcima s dodatkom drugih nutricina (selen) 193,242 mg /kg hrane.

**Diplomski rad obuhvaća:** 38 stranica, 18 slika, 7 tablica, 44 literaturnih pregleda.

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** vitamin E, hrana za nesilice, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija

**Rad prihvaćen:** 16. rujna 2021.

### **Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc.dr.sc. Ana Amić, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentor i član
3. izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, član
4. doc.dr.sc. Tomislav Balić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, Osijek

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Department of Chemistry**

**Graduate Study of Chemistry**

**Scientific Area: Natural Sciences**

**Scientific Field: Chemistry**

## **DETERMINATION OF VITAMIN E CONTENT IN LAYING HENS FEED**

**Renata Dončić**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.

**Immediate supervisor:** Manuela Grčević, Ph.D.

### **Abstract**

Vitamin E is an organic substance soluble in fats. It is very important for human health and since the human body cannot produce it on its own, it is necessary to intake it through food or dietary supplements. It is also an important food supplement in laying hens feed due to the maintenance of physiological functions and egg production and in this way the intake of vitamin E in the human body increases. The aim of the study was to determine the content of vitamin E in laying hens feed and hens feed enriched with vitamin E and various oils. Three different methods were used: direct extraction with methanol, direct ultrasound extraction and extraction with prior saponification. After extraction, samples were analyzed by means of high-performance liquid chromatography. Concentration of vitamin E was determined in samples of hens feed available on the market, samples with added oils, with the addition of other nutrients (selenium and lutein) and food with the addition of vitamin E and other nutrients. The highest concentration of vitamin E was found in samples with the addition of vitamin E and other nutrients (725.940 mg/kg of hens feed) and the lowest concentration of vitamin E was found in samples with the addition of other nutrients (selenium) 193.242 mg/kg of hens feed.

**Thesis includes:** 38 pages, 18 figures, 7 tables, 44 references.

**Original in:** Croatian

**Keywords:** vitamin E, laying hens food, High-Performance Liquid Chromatography, Ultrasonic assisted extraction

**Thesis accepted:** 16 september 2021.

### **Reviewers:**

1. Ana Amić, assistant prof., president
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Martina Medvidović-Kosanović, PhD., associate prof., member
4. Tomislav Balić, PhD., assistant prof., alternate member

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Ovaj rad izrađen je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Rad je dio istraživanja koja provodi Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane.

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. LITERATURNI DIO .....  | 2  |
| 2.1. VITAMIN E .....  | 2  |
| 2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva vitamina E .....                           | 3  |
| 2.1.2. Uloga vitamina E.....  | 4  |
| 2.1.3. Vitamin E u hrani .....  | 5  |
| 2.2. NESILICE .....   | 6  |
| 2.2.1. Hranidba nesilica.....   | 7  |
| 2.2.2. Hranidba nesilica za proizvodnju konzumnih jaja .....                    | 8  |
| 2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) .....               | 9  |
| 2.3.1. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti..... | 10 |
| 2.3.1.1. Spremnik mobilne faze i sustav za obradu otapala .....                 | 11 |
| 2.3.1.2. Crpke .....  | 11 |
| 2.3.1.3. Sustav za unošenje uzorka.....   | 12 |
| 2.3.1.4. Kolone.....  | 12 |
| 2.3.1.5. Detektori.....   | 13 |
| 2.4. ULTRAZVUČNO POTPOMOĞNUTA EKSTRAKCIJA .....                                 | 13 |
| 2.4.1. Ultrazvučna kavitacija.....  | 14 |
| 2.4.2. Ultrazvučni uređaji.....   | 15 |
| 2.5. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....                                     | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....   | 21 |
| 3.1. Kemikalije .....   | 21 |
| 3.2. Pribor i instrumentacija .....   | 21 |
| 3.2.1. Pribor.....  | 21 |
| 3.2.2. Instrumentacija.....   | 21 |
| 3.3. Uzorci za analizu.....   | 22 |
| 3.3.1. Sastav uzoraka hrane.....  | 22 |
| 3.4. Odabir postupka ekstrakcije .....  | 23 |
| 3.4.1. Direktna ekstrakcija metanolom.....                                      | 23 |
| 3.4.2. Ekstrakcija uz prethodnu saponifikaciju .....                            | 24 |
| 3.5. Provjera postupka ekstrakcije.....   | 27 |
| 3.6. Parametri analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti .....  | 28 |
| 3.6. Ispitivanje stabilnosti uzoraka .....                                      | 28 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....   | 29 |
| 4.1. Odabir postupka ekstrakcije .....  | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Provjera postupka ekstrakcije.....                           | 30 |
| 4.3. Ispitivanje stabilnosti uzoraka.....                         | 30 |
| 4.4. Analiza uzoraka hrane.....                                   | 31 |
| 4.4.1. Hrana dostupna na tržištu.....                             | 31 |
| 4.4.2. Hrana s dodanim uljima.....                                | 32 |
| 4.4.3. Hrana s dodatkom drugih nutricina.....                     | 32 |
| 4.4.4. Hrana s dodatkom vitamina E i drugih nutricina i ulja..... | 33 |
| 5. ZAKLJUČAK.....   | 34 |
| 6. LITERATURA.....  | 35 |
| 7. ŽIVOTOPIS.....   | 39 |



## 1. UVOD

Vitamini su organske tvari koji imaju različite strukture, kemijska i fizikalna svojstva. Potrebni su za regulaciju metaboličkih funkcija unutar stanica (rast, razvitak, reprodukciju), ali i za procese oslobađanja energije iz hrane. Budući da su ljudske dnevne potrebe za vitaminima od 1 µg do 100 mg, vitamini se još nazivaju i mikronutrijenti. Postoji 13 vitamina koji se dijele na vitamine topive u mastima (vitamini A, D, E i K) i vitamine topive u vodi (vitamini B kompleksa (tiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), niacin (B<sub>3</sub>), pantotenska kiselina (B<sub>5</sub>), piridoksin (B<sub>6</sub>), folna kiselina (B<sub>9</sub>), kobalamin (B<sub>12</sub>), biotin) i vitamin C). Vitamini topivi u vodi posjeduju tendenciju da imaju jednu ili više polarnih ili ionizirajućih skupina (karboksilna, keto, hidroksilna, amino ili fosfatna), dok vitamini topljivi u mastima imaju aromatske i alifatske skupine [1, 2].

Vitamine je potrebno unositi hranom jer se ne mogu dovoljno sintetizirati u organizmu, osim vitamina D i K. Svaki vitamin ima različitu biokemijsku funkciju i sudjeluju u biokemijskim reakcijama [3].

Nedostatak vitamina moguće je uočiti tek nakon nekoliko tjedana. Najčešći pokazatelji nedostatka vitamina su: ispucali uglovi usana, osip na licu, opadanje kose, crvene točkice na bedrima i obrazima, umor, peckanje, svrbež i ukočenost u području ruke i noge [4].

## 2. LITERATURNI DIO

### 2.1. VITAMIN E

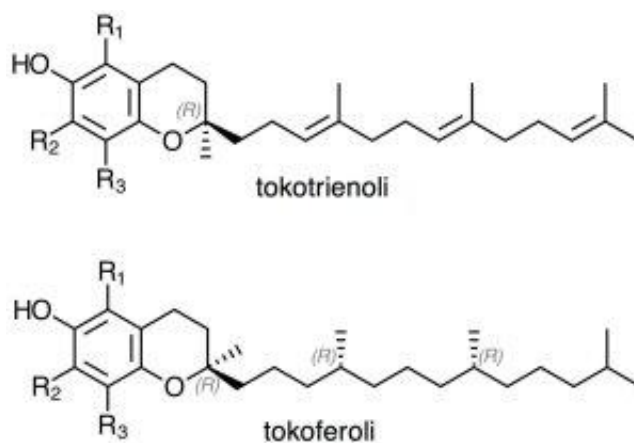
1922. godine, znanstvenici Evan i Bishop otkrili su vitamin E i okarakterizirali ga kao tvar koja je topiva u mastima. Vitamin E poznat je još i pod nazivima faktor X ili antisterilitetni vitamin. Pripada skupini spojeva koji se nazivaju tokokromanoli, a sastoji se od četiri tokoferola i četiri tokokromanola. Može se pojaviti u više oblika, odnosno može biti u obliku kapsula, krema, tableta ili kao ulje [1, 5].

Pohranjuje se u jetri, srcu, masnim tkivima, mišićima, krvi, adrenalnoj žlijezdi, hipofizi, itd. On je djelotvoran antioksidans koji sprječava oksidaciju spojeva masti, oksidaciju vitamina A, selena i nekih oblika vitamina C. Također, sprječava oksidaciju „lošega“ kolesterola (engl. *low-density lipoprotein*, LDL), usporava starenje stanica, sudjeluje u sprječavanju različitih oblika karcinoma, sprječava nastanak krvnih ugrušaka, smanjuje umor, ubrzava zacjeljivanje opekline, snižava krvni tlak, pomaže pri grčenju i istegnuću mišića, smanjuje rizik od Alzheimerove bolesti, itd. [6].

Zbog sprječavanja raznih bolesti, nutricionisti preporučuju konzumiranje 200 – 500 mg vitamina E na dan u obliku kapsula. Do danas nisu zabilježeni toksični učinci konzumiranja većih količina vitamina E, dok se u rijetkim slučajevima mogu pojaviti proljev ili glavobolja. No, važno je naglasiti da vitamin E nema toksičan učinak na organizam. U slučaju nedostatka vitamina E može doći do slabosti mišića, problema s vidom, promjene imunološkog sustava, utrnulosti, poteškoća u hodanju i disanju, kao i lošeg osjećaja ravnoteže. Osim ovih simptoma, nedostatak vitamina E može dovesti i do neuromuskularnih problema kao što su spinocerebelarna ataksija, miopatija i anemija zbog oksidativnog oštećenja crvenih krvnih stanica [1, 7].

### 2.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva vitamina E

Vitamin E obuhvaća spojeve koji pripadaju izoprenoidnim kromanolima kao što su tokoferoli, tokotrienoli i neki manje poznati oblici kao što su plastokromanoli, tokomonoenoli i drugi. Postoji osam prirodnih oblika vitamina E, a to su  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferoli i  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokotrienoli. Najčešći oblik vitamin E je  $\alpha$ -tokoferol koji se najčešće nalazi u kloroplastima biljnih stanica, a drugi uobičajeni oblik je  $\gamma$ -tokoferol koji se najčešće nalazi u uljima sjemena mnogih biljnih vrsta. Tokotrienoli se mogu naći u sjemenkama nekih biljaka, a prvenstveno u jednosupnicama [7, 8].



Slika 1. Struktura tokotrienola i tokoferola [9].

Tokoferoli i tokotrienoli su derivati kroman-6-ola koji može biti supstituiran zasićenim ili nezasićenim izoprenoidnim lancem C<sub>16</sub>. Prsten kroman-6-ola je hidrofilni dio molekule, a bočni lanac izoprenoida čini vitamin E topivim u mastima. Ako je kroman-6-ol supstituiran s zasićenim izoprenoidnim lancem C<sub>16</sub> nastaju tokoferoli, a ako je supstituiran s nezasićenim izoprenoidnim lancem C<sub>16</sub> nastaju tokotrienoli [2].

Tokoferoli i tokotrienoli posjeduju identičnu osnovnu strukturu koju karakterizira dugi izoprenoidni bočni lanac koji je pričvršćen na C-2 kroman-6-olnom prstenu. Razlikuju se po broju dvostrukih veza, položaju metilnih skupina i imaju različita biološka djelovanja. [7, 8].

Iako su tokoferoli i tokotrienoli slični po sastavu, oni imaju različita biološka djelovanja. Tokotrienoli imaju protuupalna i antioksidativna svojstva koja mogu sniziti razinu kolesterola, spriječiti karcinome, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Istraživanja su pokazala da je  $\gamma$ -tokotrienol učinkovit protiv karcinoma gušterače i prostate, te da je čak 30 puta veća razlika u sposobnosti  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokotrienola da inhibiraju biosintezu kolesterola. Najveću biološku aktivnost kod tokoferola ima  $\alpha$ -tokoferol, koji je jedini prihvatljiv oblik u organizmu. Budući da je topiv u mastima, najčešće se skladišti u jetri i masnom tkivu [1, 10].

Vitamin E je topiv u mastima, uljima i nepolarnim otapalima, slabo je topiv u acetonu i etanolu, a potpuno je netopiv u vodi. Stabilan na povišenim temperaturama, a osjetljiv je na izloženost zraku i svjetlu pa se zato čuva u posudama s inertnim plinom kako ne bi došlo do njegove razgradnje [2].

### 2.1.2. Uloga vitamina E

Najvažnija uloga vitamina E je njegova antioksidativna zaštita polinezasićenih masnih kiselina u organizmu koje se nalaze u staničnoj membrani. Vitamin E zbog svog bočnog lanca u strukturi voli masnoće odnosno staničnu membranu. U organizmu spontano nastaju štetne reaktivne kisikove molekule koje ih mogu oksidirati pri čemu nastaju slobodni radikali, a vitamin E se oksidira. Zatim vitamin C reducira radikal vitamina E koji se može vratiti natrag u svoju funkciju, a vitamin E se uz pomoć glutaciona regenerira. I tako organizam reducira i prikuplja određene količine vitamina C i E. Dnevna potreba za vitaminom E ovisi o unosu nezasićenih masnih kiselina u prehrani. Što je više nezasićenih masnih kiselina u prehrani to se povećava opasnost da će njihovu strukturu narušiti slobodni radikali. Kako bi se to izbjeglo, potreban je vitamin E. Utvrđeno je da  $\alpha$ -tokoferol inhibira proizvodnju novih slobodnih radikala, dok  $\gamma$ -tokoferol hvata i neutralizira postojeće slobodne radikale. Oksidacija je povezana s mnogim bolestima kao što su starenje, artritis, karcinom i katarakta (siva mrena). Dakle, vitamin E može pomoći u sprečavanju ili odgađanju kroničnih bolesti povezanih s reaktivnim kisikovim molekulama [11, 7].

Kardiovaskularne komplikacije nastaju zbog oksidacije lipoproteina niske gustoće koji su prisutni u tijelu. Utvrđeno je da  $\gamma$ -tokoferol poboljšava kardiovaskularne funkcije povećanjem aktivnosti sinteze dušikovog oksida. Istraživači su otkrili da dnevno 100 mg

$\gamma$ -tokoferola kod ljudi dovodi do smanjenja nekoliko čimbenika rizika za arterijsko zgrušavanje. Osim tokoferola, tokotrienoli inhibiraju biosintezu kolesterola suzbijanjem 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktaze, a to rezultira snižavanjem kolesterola koji proizvode stanice jetre. No, većina nedavnih kliničkih ispitivanja nije pokazala kardiovaskularne koristi od suplementacije vitaminom E pa je to potrebno dodatno istražiti [7].

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) javlja se kao posljedica oksidacije proteina i peroksidacije lipida pomoću mehanizma slobodnih radikala gdje protein beta-amiloid izaziva citotoksičnost kroz mehanizam koji uključuje oksidativni stres, a to dovodi do smrti neuronskih stanica i AD-a. Istraživanje Udruge za Alzheimerovu bolest pokazalo je da vitamin E može usporiti napredovanje bolesti kod bolesnika s umjereno teškim AD-om. Visoke razine vitamina E u plazmi dovode do smanjenja rizika od AD-a kod starijih bolesnika. Međutim, istraživači su preporučili da pacijenti ne smiju bez nadzora liječnika uzimati vitamin E za liječenje AD-a jer u velikim količinama i u kombinaciji s drugim lijekovima može negativno djelovati na organizam [7].

Vitamin E je koristan u fazi oporavka od nekih bolesti, poboljšava cirkulaciju krvi jer širi krvne žile i štiti od visokog tlaka. Ulje vitamina E je jedan od glavnih sastojaka kozmetičkih proizvoda jer ima mogućnost neutralizacije štetnih učinaka UV zraka koje su sastavni dio u procesu preranog starenja kože. Zahvaljujući svojim regenerativnim svojstvima, ulje vitamina E izgladuje bore i čini kožu sjajnijom. Također, potiče proizvodnju kolagena koji drži kožu elastičnom, smanjuje opekline od sunca, umanjuje ožiljke od akni, liječi ispucale usne i ublažava herpes [12].

### 2.1.3. Vitamin E u hrani

Budući da naš organizam ne može sam proizvesti vitamin E, potrebno ga je unositi kroz hranu ili dodatke prehrani. Najveća količina vitamina E (Slika 2) nalazi se u ulju šafrana, suncokreta, pšeničnih i kukuruznih klica. Osim ulja, vitamin E nalazi se i u lisnatom zelenom povrću, mlijeku, ribi, žumanjku jajeta i u orašastim plodovima kao što su sjemenke suncokreta, badema, orasa i kikirikija [13].

Sadržaj tokoferola u kravljem mlijeku je puno veći ljeti nego zimi zbog promjene u prehrani životinja pa se vitamin E ponekad dodaje punomasnom mlijeku u prahu i žitaricama za doručak. Također se koristi i kao dodatak u hrani za nesilice jer povećava svoj sadržaj u jajima i zbog svog antioksidativnog djelovanja ih stabilizira [2, 14].



Slika 2. Hrana bogata vitaminom E [15].

## 2.2. NESILICE

Prema podacima Centra za peradarstvo u Hrvatskoj se godišnje uzgaja oko 600 tisuća rasplodnih nesilica teških hibrida, 40 milijuna pilića, 22 tisuće rasplodnih nesilica hibrida lakih linija i oko 1,7 milijuna konzumnih nesilica. U Hrvatskoj se povećava peradarska proizvodnja zbog opskrbe stanovništva s proizvodima kao što su meso i jaja. Oko 30 % proizvodnje jaja dolazi iz poluintenzivne proizvodnje, a oko 70 % iz proizvodnih sustava. Proizvodnja je organizirana kao intenzivna proizvodnja u tvrtkama, ali i na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Dok se poluintenzivna sezonska proizvodnja odvija na okućnicama [14, 16].

Za proizvodnju konzumnih jaja važne su pasmine lakih nesilica, a za proizvodnju mesa su važne kombinirane pasmine nesilica [14, 17].

Najvažnije karakteristike lakih pasmina su njihova mala tjelesna masa i velika proizvodnja jaja. Tjelesna masa pijetlova može iznositi 2,7 – 3,6 kg, a ženki 1,8 – 2,0 kg. Nesivost ove pasmine može biti i do 230 jaja godišnje. Za proizvodnju konzumnih jaja

uzgajaju se ženke jer za ovakvu proizvodnju nisu potrebna oplođena jaja. Najpoznatije lake pasmine su Minorca, Leghorn, Talijanska, Andaluzijska i Hamburška kokoš [14, 17].

Kombinirane pasmine imaju dobru razvijenost tijela, mesnatost trupa i nosivost jaja. Kod nekih pasmina je vrlo izražena nesivost, dok je kod drugih izražena mesnatost. Masa kokoši iznosi 2,5 – 3,8 kg, a pijetlova 4 – 5,5 kg, imaju rahlo raspoređeno perje i godišnje nesu do 200 jaja. Nastale su križanjem teških pasmina i pasmina za borbu. Najpoznatije kombinirane pasmine su Rhode Island, New Hampshire, Plymouth Rock, White Rock, Sussex, Dorking i Houdan [14, 17].

### 2.2.1. Hranidba nesilica

Nesilice s visokim potencijalom za proizvodnju jaja zahtjevaju pravilnu hranidbu i konzumiraju kvalitetna koncentrirana krmiva. Njihov organizam sastoji se od 23 aminokiseline. Smjese za nesilice moraju imati izbalansiran aminokiselinski sastav jer neke od njih organizam može sam sintetizirati, dok esencijalne aminokiseline moraju dobivati u hrani. Potrebe nesilica za aminokiselinama ovisi o vrsti, pasmini, intenzitetu proizvodnje jaja, odnosu između aminokiselina, odnosu prema vitaminima, itd. Esencijalne aminokiseline za nesilice su: metionin, lizin, histidin, triptofan, arginin, valin, fenilalanin, treonin leucin i izoleucin. A nesencijalne aminokiseline nesilice sintetiziraju iz prekursora dušika, ugljikohidrata, ali i nekih drugih aminokiselina [14, 18].

U hranu za nesilice dodaju se masti i ulja kako bi hrana bila obogaćena esencijalnim masnim kiselinama kao što su linolna, linoleonska i arahidonska. One se nakupljaju u potkožnom sloju i stvaraju rezervu energije koja sudjeluje u strukturi jaja [14, 19].

U hrani za nesilice nalazi se 7 – 8 % sirovih vlakana. Najčešće se upotrebljava hrana koja je bogata sirovim vlaknima da bi se spriječilo tovljenje nesilica. No, velike količine sirovih vlakana loše utječu na taloženje masti i probavljanje hrane jer nesilice slabo probavljaju hranu koja sadrži visoke količine vlakana [14].

Vitamini su važni nesilicama zbog održavanja fizioloških funkcija i proizvodnje jaja te svi osim vitamina D i E sudjeluju u enzimatskim procesima. Neke vitamine mogu sami sintetizirati, ali u nedovoljnim i ograničenim količinama. Vitamini topivi u vodi mogu se u malim količinama odlagati u organima, a vitamini topivi u mastima mogu se u većim

količinama odlagati u jetri. Potreba nesilica za vitaminom E povećava se kada njihovi obroci sadrže visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina koje su podložne oksidaciji. Vitamin E je potreban zbog normalnog rasta embrija i prevencije steriliteta kod pijetlova. Ako u hrani za nesilice nema dovoljne količine vitamina E može doći do različitih bolesti kao što su encefalomacija, nutritivna mišićna distrofija i eksudativna dieteza [14, 20].

### 2.2.2. Hranidba nesilica za proizvodnju konzumnih jaja

Za proizvodnju konzumnih jaja koriste se linijski hibridi koji zahtjevaju pravilno držanje i hranidbu. To podrazumijeva kompletne i izbalansirane krmne smjese koje sadrže sve potrebne hranjive sastojke u najoptimalnijim omjerima. U proizvodnji konzumnih jaja koristi se 2,2 – 2,4 kg hrane za dobivanje jednog kilograma proizvedenih jaja, odnosno dnevno nesilice konzumiraju od 120 - 130 g hrane. Dnevni obroci sastavljeni su od nekoliko komponenti koji omogućavaju potrebnu količinu energije za rast, reprodukciju i zdravlje. Svoj peradi pa tako i nesilicama su potrebna visokoenergetska koncentrirana krmiva jer imaju visoku potrebu za energijom budući da imaju intenzivan metabolizam, visoku tjelesnu temperaturu i kratak probavni sustav. Općenito se krmiva mogu podijeliti na energetska, bjelančevasta i mineralna, a visokoenergetskim koncentriranim krmivima pripadaju kukuruz, pšenica, ječam, raž i druge žitarice. Uz krmiva se u obroke dodaju još i različiti mineralno-vitaminski dodaci i aditivi [17, 21].

Bjelančevasta krmiva mogu biti biljnog ili životinjskog podrijetla. Od krmiva biljnog podrijetla najbolje su sojina i suncokretova sačma, a od krmiva životinjskog podrijetla najbolje je riblje brašno. Sojina sačma sadrži oko 44 % sirovih bjelančevina i oko 21 % ulja, dok suncokretova sačma sadrži 33 – 42 % sirovih bjelančevina i ima dva puta više metionina, ali nema lizina. Riblje brašno je bogato bjelančevinama, kalcijem, fosforom i vitaminom B<sub>12</sub>. Od esencijalnih aminokiselina sadržava triptofan, lizin i metionin, a od minerala najviše sadrži kalcij, fosfor, mangan, željezo i jod. Riblje ulje ima specifičan miris koji se prenosi na jaja pa se u hranu ne dodaje u velikim količinama [17, 21].

U hranu se dodaju različiti dodaci koji sadržavaju vitamine, oligoelemente, aditive i aminokiseline koje sa svojim organoleptičkim svojstvima, mirisom i okusima poboljšavaju hranu i ne smiju sadržavati patogene organizme. U hrani za nesilice najvažnija i najzastupljenija komponenta je energija, a zatim bjelančevine, minerali, vitamini i drugi



elementi u malim količinama. Energetske promjene se uglavnom podmiruju iz ugljikohidrata, a manje iz masti i bjelančevina. Ako se nesilice hrane nekvalitetnom hranom doći će do smanjenja proizvodnje jer kakvoća hrane utječe na kakvoću jaja, odnosno na boju žumanjka i tvrdoću ljuske [21].

### 2.3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Kromatografija je metoda razdvajanja komponenti iz smjese. Sastoji se od pokretne faze koja se naziva mobilna faza i od nepokretne faze koja se naziva stacionarna faza. Mobilna faza je fluid koji se kreće kroz kolonu u kojem se nalazi stacionarna faza, a stacionarna faza može biti čvrsta, kapljevit ili u obliku gela [22].

Prve kromatografske analize provodile su se u staklenim kolonama s promjerom 1-5 cm i duljinom 50-500 cm. Vrijeme odjeljivanja je bilo dugo pa čak i do nekoliko sati jer je brzina protoka bila nekoliko desetinki mililitra u minuti [23].

Tek kasnih 60-ih godina razvila se kromatografska metoda pod nazivom tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) koja je koristila složenije uređaje za analizu, a punila su bila promjera od 10  $\mu\text{m}$ . HPLC (Slika 3) je vrlo brza i osjetljiva metoda koja s velikom preciznošću razdvaja smjese na pojedinačne komponente. Kao mobilna faza koristi se otapalo koje je nepolarno, npr. heksan, a za stacionarnu fazu se koristi najčešće silikagel. Neke od prednosti HPLC metode su: njezina osjetljivost, prilagodljivost, jednostavnost pri čišćenju i pripremi uzoraka, može biti potpuno automatizirana i ima široki spektar uzoraka [22, 24].

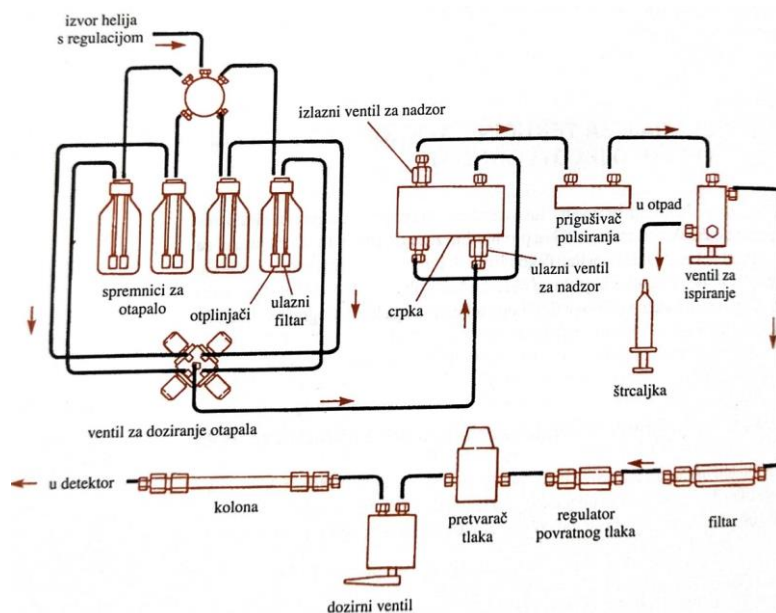
HPLC se najčešće koristi u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj i industrijskoj praksi za određivanje i odjeljivanje polarnih i nepolarnih spojeva [25].



Slika 3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti [26].

### 2.3.1. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Kako bi se postigla velika brzina protoka u kolonama kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, potrebni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa. Kako bi se postigli tako visoki tlakovi potrebna je kompleksnija i skuplja oprema nego ona koja se koristi kod drugih vrsta kromatografije. Na slici 4. prikazani su dijelovi tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti koji se sastoji od: spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala, crpke, sustava za unošenje uzorka, kolone i detektora [23].



Slika 4. Shematski prikaz uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti [23].

### 2.3.1.1. Spremnik mobilne faze i sustav za obradu otapala

Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti može se sastojati od jednog ili više staklenih ili čeličnih spremnika u kojima se nalazi otapalo [23].

Uloga sustava za obradu otapala je isporučiti mobilnu fazu kroz kromatograf. Sastoji se od crpke, kontrolnih ventila, regulatora protoka, prigušivača impulsa i tlačnih sonda, a svaki dio treba održavati kako bi se osigurale ponovljive brzine protoka. Uz sustav za obradu otapala smještena je aparatura za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz tekućina. Otplinjavanje je proces u kojem se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala kako ne bi doveli do širenja zona eluiranih komponenti, a prenose se mjehurićima inertnog plina koji je netopljiv u mobilnoj fazi. Najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti je izokratska elucija gdje analit kroz kolonu nosi samo jedno otapalo, a ne dolazi do promjene sastava mobilne faze tijekom elucije. No, bolji kromatogram se dobije gradijentnom elucijom kada se upotrebljavaju dva sustava otapala koja se međudobno razlikuju, a sastav mobilne faze se mijenja tijekom elucije kontinuirano ili skokovito [23, 27].

### 2.3.1.2. Crpke

Crpke imaju nekoliko zahtjeva koje moraju zadovoljiti kako bi se koristile za tekućinsku kromatografiju, a to su: tlakovi do 40 milijuna Pa, izlaz mora biti bez pulsiranja tlaka, brzine protoka moraju biti od 0,1 - 10 mL/min, ponovljivost protoka mora biti 99,5 % ili bolja i moraju biti otporne na koroziju koja može biti izazvana upotrebom različitih otapala. Najčešće crpke koje se koriste za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su crpka s vijčanim pogonom i recipročna crpka. Recipročne crpke sastoje se od male komore koja se puni i prazni na principu pomicanja klipa naprijed-natrag. Njezine prednosti su: visoki vanjski tlak, mali unutarnji volumen i stalni protoci koji ne ovise o tlaku u koloni i viskoznosti otapala, itd. Crpka s vijčanim pogonom stvara protok tekućine koji je ravnomjeran i može se nadzirati. Njezini najveći nedostaci su: mali kapaciteti crpke i nepogodnost za promjenu otapala [23].

### 2.3.1.3. Sustav za unošenje uzorka

Sustav za unošenje uzorka može biti manualni ili automatski (engl. *autosampler*). Kod manualnog unošenja uzorka, ventil se makne s kolone, a uzorak se injekcijskom štrcaljkom unosi na početak punila. U tekućinskoj kromatografiji uzorak se unosi u kolonu pomoću plinskog ventila koji je ujedno i sastavni dio opreme suvremenog tekućinskog kromatografa. Uz plinski ventil nalaze se i nekoliko izmjenjivih petlji uz pomoću kojih se mogu unositi uzorci od 5  $\mu$ L do 50  $\mu$ L, a veličina petlje može se mijenjati ovisno o količini uzorka [23].

Autosampleri funkcioniraju na isti način kao i manualni, osim što se uzorak automatski unosi iz bočice uzorka. Uzorak se unosi u petlju na različite načine: bočica se može pritisnuti pod tlakom kako bi se uzorak istjerao ili se za izvlačenje uzorka može upotrijebiti štrcaljka. Štrcaljku kontrolira motor tako da se različite količine uzoraka mogu ponovno ubrizgati djelomičnim punjenjem petlje uzorka. Nakon učitavanja petlje uzorka, ventil se električno pokreće. Neki autosampleri uključuju i druge značajke kao što su grijanje ili hlađenje uzoraka i mogućnost izvođenja standardnih dodataka pa se na takav način poboljšava preciznost analize. Bočice autosamplera dostupne su u različitim veličinama, oblicima i materijalima. Za analitički rad standardne bočice autosamplera su od 1 mL do 4 mL. Većina bočica izrađena je od bistrog borosilikatnog stakla, ali bočice boje jantara dostupne su za uzorke osjetljive na svjetlost [27].

### 2.3.1.4. Kolone

Kolona je srce kromatografskog sustava, a njezina uloga je da omogući separaciju uzorka. Duljina, promjer i materijal od kojeg je građena kolona utječu na vijek trajanja, učinkovitost i brzinu separacije. Kolona mora biti napravljena od materijala koji podnose visoke tlakove koji se koriste u HPLC-u i mora biti kemijski otporna na mobilnu fazu. Najčešće kolone koje se upotrebljavaju izrađene su od čeličnih cijevi, ali upotrebljavaju se i staklene cijevi debljih stijenki [23, 27].

Duljina kolone utječe na učinkovitost i brzinu separacije, a dulje kolone rezultiraju duljim vremenom analize. Kako bi se smanjilo vrijeme analize koriste se kraće kolone. One

su najčešće duge 10-30 cm, unutrašnji promjer je 4-10 mm, a promjer zrna punila 5-10  $\mu\text{m}$  [23].

Budući da HPLC kolone imaju ograničen vijek trajanja, potrebno je paziti na njihovu upotrebu. A prije uvođenja u kromatografski sustav, eluent treba profiltrirati kako bi se spriječila kontaminacija kolone iz uzorka [27].

#### 2.3.1.5. Detektori

Detektor je instrument koji mjeri prisutnost određenih komponenti koje izlaze iz kolone i pretvara ih u električni signal koji se sprema u sustav za obradu podataka. Ne postoji određena skupina detektora koja se može koristiti za HPLC analizu. Najčešće se koriste detektori koji prate promjenu svojstava mobilne faze (detektor indeksa loma i električne vodljivosti) i detektori analita (detektor UV/VIS zračenja, elektrokemijski i fluorescencijski detektor). Zahtjevi koji se postavljaju pred detektore za HPLC analizu su: brz odziv, visoka osjetljivost, linearni odziv, dobra stabilnost, što manji volumen uzorka i jednostavnost rukovanja [28].

## 2.4. ULTRAZVUČNO POTPOMOGNUTA EKSTRAKCIJA

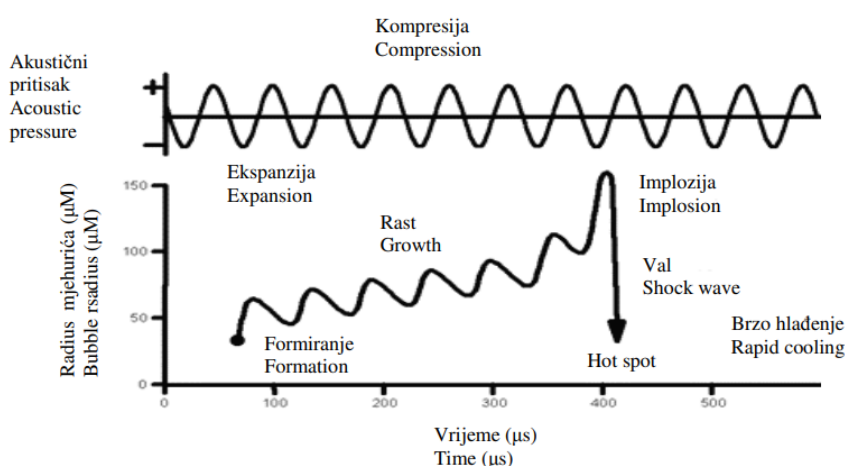
Za odvajanje hlapljivih i poluhlapljivih organskih spojeva iz tekućih i čvrstih uzoraka mogu se koristiti različite tehnike ekstrakcije. No, one su dugotrajne, mogu biti relativno skupe i zahtijevaju korištenje velikih količina toksičnih organskih otapala [29].

Stoga je ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija (engl. *Ultrasound assisted extraction*, UAE) povoljna alternativa konvencionalnim i modernim tehnikama ekstrakcije. To je nova tehnika pripreme uzorka za ekstrakciju organskih spojeva iz tekućih i čvrstih uzoraka. Temelji se na principu ultrazvučne kavitacije odnosno na korištenju ultrazvučne energije kako bi se osigurao učinkovitiji kontakt između uzorka i otapala za ekstrakciju i na takav način se omogućavaju brze ekstrakcije organskih spojeva iz tekućih i čvrstih smjesa. Osim brže ekstrakcije, ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija ima i drugih prednosti, a to su: smanjena upotreba organskog otapala, istodobno se može izvesti nekoliko ekstrakcija, može se koristiti širok raspon veličine uzorka, a aparatura je jednostavna za rukovanje i relativno je jeftina [30].

Ultrazvučno potpomognuta ekstrakcija se najčešće primjenjuje za ekstrakciju različitih organskih tvari iz tekućih i čvrstih uzoraka kao što su: površinski aktivne tvari, barbiturati, klorofenoli, esteri masnih kiselina, fitosteroli, izoflavonoidi, mikotoksini, ulja, poliklorirani bifenili, pesticidi, steroidi, triterpenoidi itd. [30].

#### 2.4.1. Ultrazvučna kavitacija

Longitudinalni valovi nastaju širenjem zvučnog vala kroz tekući medij pri čemu nastaje kompresija i ekspanzija koje se međusobno izmjenjuju. Kod kompresije i ekspanzije (Slika 5) dolazi do promjene tlaka u tekućem mediju gdje se javlja kavitacija i nastaju mjehurići (šupljine). U fazi ekspanzije mjehurići uvijek malo više narastu zbog promjene tlaka u mediju. Kada mjehurić dosegne određenu kritičnu točku, više ne dolazi do apsorpcije energije i on se urušava sam. Zbog velikih promjena tlaka dolazi do stvaranja udubljenja koja nastaju zbog povećane difuzije plina u mjehuriću tijekom ekspanzijskog ciklusa. Također, ako se u mjehuriću ne može održavati plinska faza, može doći i do kondenzacije gdje se molekule sudaraju jako velikom brzinom i nastaju udarni valovi. Takvi valovi mogu stvoriti visoke tlakove (do 100 MPa) i temperature (do 5500 K) zbog čega dolazi do promjene fizikalno-kemijskih svojstava molekula [31].



Slika 5. Nastanak kavitacijskih mjehurića kod kompresije i ekspanzije [31].

Ultrazvučna kavitacija je fizikalni fenomen koja ovisi o frekvenciji, intenzitetu, otapalu, temperaturi i vanjskom tlaku [30].

Kako bi ekstrakcija bila učinkovita, potrebno je uskladiti intenzitet i frekvenciju jer se povećanjem frekvencije otežava nastajanje kavitacijskih mjehurića. Kako bi se to izbjeglo potrebno je pri povećanju frekvencije, povećati i intenzitet [31].

Otapalo koje se koristi za obradu uzoraka ultrazvukom mora biti pažljivo odabrano. Općenito je da se većina primjena izvodi u vodi, ali mogu se koristiti i neke druge manje polarne tekućine poput nekih organskih otapala. Očekuje se da će viskoznost otapala i površinska napetost inhibirati kavitaciju zbog prisutnosti kohezijskih sila. Što su veće prirodne kohezijske sile koje djeluju u tekućini (npr. velika viskoznost i velika površinska napetost), to je teže postići kavitaciju. Kako bi se izbjegla inhibicija kavitacije u tekućinu se dodaju površinski aktivne tvari koje smanjuju površinsku napetost [30, 31].

Temperatura otapala kod ultrazvuka ima dvije uloge. S jedne strane, uporaba visokih temperatura pomaže u narušavanju jakih interakcija kod otopljenog uzorka, a uključuju van der Waalsove sile, vodikovu vezu i dipol-dipol interakcije. S druge strane, kavitacija se bolje postiže pri nižim temperaturama jer se s povećanjem temperature, povećava tlak pare pa više para otapala ispunjava kavitacijske mjehuriće koji se zatim teže i manje urušavaju [30].

Ako se poveća vanjski tlak, potrebna je veća ultrazvučna energija za indukciju kavitacije, odnosno za razbijanje molekularnih sila otapala. Za određenu frekvenciju postoji određeni vanjski tlak, ali većina ultrazvučnih primjena u analitičkoj kemiji izvodi se pri atmosferskom tlaku [31].

#### 2.4.2. Ultrazvučni uređaji

U kemiji se ultrazvuk može primijeniti na dva načina: izravno na uzorak ili neizravno preko stijenke posude u kojoj se nalazi uzorak. Neizravna primjena se može izvesti uz pomoć ultrazvučne kupelji (Slika 6) gdje ultrazvučni valovi prvo prolaze kroz tekućinu, a zatim kroz stijenku posude kako bi došli do uzorka. Stoga je intenzitet ultrazvučnih valova unutar stijenki posude uzorka niži od očekivanog. Zbog nedostatka intenziteta ultrazvučnih valova, ultrazvučne kupke nisu snažni uređaji pa je zbog toga njihova primjena ograničena. Međutim, danas se umjesto ultrazvučne kupke može koristiti sonoreaktor. On radi poput

male, snažne, ultrazvučne kupke i ima veću snagu od običnih ultrazvučnih kupki. A dokazano je da se uz pomoću sonoreaktora mogu ubrzati kemijske reakcije kao što su identifikacija proteina i specijacija metala [30].



Slika 6. Ultrazvučna kupelj [32].

Izravna primjena postiže se ultrazvučnim sondama (Slika 7) koje su uronjene u uzorak i imaju mnogo veći intenzitet ultrazvučnih valova od ultrazvučne kupke. Sastoji se od generatora, pretvornika, standardnog roga, pojačivača i sonde ili odvojivog roga. Uloga generatora je da pretvara napon u električnu energiju koju pretvornik pretvara u vibracije određene energije. Uloga standardnog roga i pojačivača je da povećava amplitudu ultrazvučnih valova, a sonda ili odvojivi rog prenose dobivenu ultrazvučnu energiju u uzorak [30].



Slika 7. Uređaj za ultrazvučnu ekstrakciju sa sondom [33].



Što je veća amplituda ultrazvučnih valova, temperatura se brže povećava. Ako se temperatura ne kontrolira mogu se pojaviti neželjeni učinci odnosno može doći do isparavanja analita niske hlapljivosti i do promjene fizikalnih svojstava medija gdje se ne postiže kavitacija. To se može izbjeći upotrebom ledene kupelji, posuda za odvođenje topline ili korištenjem pulsog sustava [30].

Ovaj pristup ima nekoliko nedostataka. Na primjer, može se očekivati kontaminacija uzorka metalima koji se odvajaju od sonde. Iako su moderne ultrazvučne sonde izrađene od titana visoke čistoće može doći do kontaminacije metalima kao što su Cr ili Al. No, moderne ultrazvučne sonde koje su izrađene od stakla smanjuju ovaj problem. Drugi nedostatak je taj što se većina ultrazvučnih sonda koristi u otvorenim uvjetima gdje spremnik uzorka nije zatvoren tijekom analize uzorka [30].

## 2.5. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Upotrebom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) može se odrediti  $\alpha$ -tokoferol u hrani za životinje (ječam, sijeno, brašno i silaža). Metoda se sastoji od tri glavna koraka: ekstrakcije, saponifikacije i kromatografije. Prije upotrebe ječam, sijeno i brašno su se samljeli, a mokri uzorci poput silaže su sitno nasjeckani. U PTFE bocu dodano je 5 g uzorka, 10 mL otopine askorbinske kiseline i klorovodične kiseline (5:7) i 10 mL etanola. Smjesa se centrifugirala 15 min. Dodano je 40 mL etil-etera i 40 mL vode, te se smjesa ponovno centrifugirala 10 min. Nastala su dva sloja, a gornji eterski sloj prikupio se i uparavao na rotacijskom uparivaču do volumena od 5 mL. Ekstrakt se prebacio u vruću vodu kuplj gdje je eter ispario pod strujom dušika i dodano je 3 mL 2% askorbinske kiseline u etanolu i 0,7 mL 60% kalijevog hidroksida u vodi. Otopina se zagrijavala 15 min pri 70°C, a zatim ohladila te je dodano 4 mL n-heksana i 3 mL destilirane vode. Injektirano je 50  $\mu$ L otopine u HPLC s fluorescencijskim detektorom. Koncentracija  $\alpha$ -tokoferola u sijenu iznosi 3,5 ppm, u brašnu 5,4 ppm, a u silaži 28,5 ppm. Iskorištenje je u rasponu od 80 – 90% [33].

Murray i sur. usporedili su dvije osnovne metode za određivanje  $\alpha$ -tokoferola u hrani za životinje (ječam, sijeno, brašno, silaža): ekstrakcija organskog otapala nakon čega slijedi saponifikacija (metoda A) i saponifikacija nakon čega slijedi ekstrakcija (metoda B). Ekstrakcija se u obje metode provodila s heksanom, a kod saponifikacije se kao antioksidans za metodu A koristila askorbinska kiselina, a za metodu B pirogalol. Rezultati tekućinske

kromatografije s fluorescencijskom detekcijom pokazali su različite količine  $\alpha$ -tokoferola iz istih uzoraka hrane za životinje. Jedina hrana koja nije pokazala razliku bila je silaža, dok su svi ostali uzorci pokazali više vrijednosti kada je korištena metoda B. Najveće koncentracija  $\alpha$ -tokoferola (20  $\mu\text{g/g}$ ) određena je u ribljem brašnu [34].

Cilj ovog rada bio je razviti metodu za istovremeno određivanje vitamina E u hrani za životinje ekstrakcijom u jednom koraku i HPLC analizom. Ispitani su različiti analitički uvjeti koji su uključivali veličinu čestica uzorka, otapala za ekstrakciju, omjer otapala i uzorka i vrijeme ekstrakcije. Otapala koja su se koristila za ekstrakciju su n-heksan, n-heksan:benzen (70:30), n-heksan:etil acetat (70:30), kloroform, aceton:kloroform (30:70), a uzorci su se analizirali pomoću HPLC kromatografa s UV-VIS detekcijom. Dobiveni rezultati usporedili su se s AOAC metodom i utvrđeno je da je ekstrakcija s aceton-kloroform (30:70) najbolja za ekstrakciju vitamina E i da koncentracija vitamina E u hrani za životinje iznosi 5,49  $\mu\text{g/g}$  [35].

Cohen i Lapointe koristili su HPLC metodu za određivanje vitamina E u hrani za životinje (hrana za svinje, piliće i pure). Metoda uključuje izravnu ekstrakciju s izooktanom i 1,4-dioksanom, nakon čega slijedi saponifikacija gdje se u uzorak dodala askorbinska kiselina kako bi se spriječila oksidacija vitamina E. Dodatno pročišćavanje postignuto je korištenjem Sep-Pak silikagela koji je uklonio veliki dio karotenoida iz uzorka i zadržao većinu polarnih sastojaka koji se nalaze u hrani. Uzorci se se analizirali pomoću HPLC uređaja s UV detekcijom, a kao mobilna faza koristila se otopina heksan-diklormetan-izopropanol. U hrani za svinje pronađeno je 51,8 mg  $\alpha$ -tokoferola, u hrani za piliće 16,36 mg  $\alpha$ -tokoferola i u hrani za pure 24,54 mg  $\alpha$ -tokoferola [36].

Cilj ovog istraživanja bio je optimizirati metodu za određivanje sadržaja osam različitih izomera vitamina E ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferole i tokotrienole) u povrću, jajima, biljnim uljima, brašnu i sjemenkama pomoću HPLC uređaja s fluorescencijskom detekcijom. Optimizirana metoda sastojala se od izravne ekstrakcije otapalom heksan:etilacetat (85:15), a za kromatografsku analizu koristila se mobilna faza heksan:izopropanol:octena kiselina (98,9:0,6:0,5). Potvrđeno je da je metoda ekstrakcije uzoraka omogućila savršenu identifikaciju i kvantifikaciju spojeva. Iz kromatograma analiziranih uzoraka uočeno je da su se svi izomeri vitamina E pojavili u uzorcima, a prevladavali su  $\alpha$ - i  $\gamma$ -tokoferoli. Ostali izomeri pojavili su se u malim količinama, dok je  $\delta$ -tokotrienol bio najrjeđi u uzorcima. Granice detekcije za tokoferole bile su u rasponu od 21 ng/mL do 48 ng/mL, a za tokotrienole

u rasponu od 56 ng/mL do 67 ng/mL, dok su granice kvantifikacije za tokoferole bile u rasponu od 105 ng/mL do 240 ng/mL, a za tokotrienole u rasponu od 280 ng/mL do 335 ng/mL [37].

U ovom radu razvijena je metoda za određivanje vitamina E s posebnim naglaskom na tokotrienole u 109 različitih vrsta riže. Metoda se temeljila na izravnoj ekstrakciji otapala u jednom koraku i HPLC analizi. Svaki uzorak riže ekstrahiran je s 2-propanolom i butilhidroksitoluenom (BHT), a smjesa se centrifugirala 10 minuta. Prikupljen je 1,0 mL supernatanta koji se razrijedio s heksanom kako bi se dobio konačni volumen od 5,0 mL. Pripremljena otopina filtrirana je, a 40  $\mu$ L otopine analiziralo se u HPLC uređaju s fluorescencijskom detekcijom. Kao mobilna faza koristila se otopina heksan-1,4-dioksan-2-propanol (100:40:5). Rezultati su pokazali da su Kouchi-Akamai (1430  $\mu$ g/g), Joushuu (1365  $\mu$ g/g) i Wataribune (1351  $\mu$ g/g) bile sorte s najvišim vrijednostima ukupnog sadržaja tokotrienola, dok je najniža razina tokotrienola pronađena u Shoni (410  $\mu$ g/g) [38].

U radu je opisan pojednostavljeni pristup saponifikacije za određivanje vitamina E u mlijeku u prahu, jetri, krvi, ribi, maslascu, margarinu i sojinom ulju. U uzorke je dodan etanol koji sadrži pirogalol, standardna otopina  $\alpha$ -tokoferola otopljena u etanolu i otopini kalijevog hidroksida, a uzorci su se inkubirali 7 min na 70°C. Nakon hlađenja dodano je otapalo za ekstrakciju (dipropil eter) i smjesa se centrifugirala 10 minuta. Nakon centrifugiranja, gornji sloj otopine je ubrizgan u HPLC uređaj obrnute i normalne faze s fluorescencijskom detekcijom. Rezultati kod obrnute faze HPLC pokazali su najveću prisutnost  $\alpha$ -tokoferola u svim uzorcima u rasponu od 0,13 mg do 27,3 mg, a kod normalne faze eHPLC prisutnost  $\alpha$ -tokoferola u svim uzorcima osim krvi i jetre u rasponu od 0,43 mg do 27,5 mg [39].

Razvijena je brza plinska kromatografska metoda za određivanje dodatka  $\alpha$ -tokoferola acetata u različitim vrstama smjesa hrane za životinje. Metoda se temelji na jednostavnoj n-heksanskoj ekstrakciji uzoraka hrane za životinje koji su prethodno obrađeni otopinom octene kiseline u eteru. Hrana za životinje koja sadrži  $\alpha$ -tokoferol acetat povrgnuta je kratkoročnom i dugotrajnom skladištenju na 5, 25, 35 i 60°C i uzorci su analizirani su nakon 1, 2, 3 dana i nakon 3 mjeseca. Analize uzoraka rađene su u plinskom kromatografu s plameno-ionizacijskom detekcijom. Rezultati nakon 3 dana skladištenja prikazuju koncentraciju  $\alpha$ -tokoferol acetata u rasponu od 4630 mg/kg do 5330 mg/kg, a utvrđeno je da se ta koncentracija nije puno promijenila ni nakon 3 mjeseca skladištenja [40].

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) može se koristiti za određivanje vitamina E u hrani za životinje. Ekstrakcija se provodila na hrani za pse, svinje i perad. Uzorci su hidrolizirani s otopinom KOH, te je dodan etanol, BHT, otopina natrijevog askorbata i EDTA. Smjesa se 5 minuta zagrijavala pod refluksom na vodenoj kupelji i dodana je otopina KOH. Nakon hlađenja, hidrolizat se profiltrirao. Za pročišćavanje i ukocentriranje uzoraka pomoću SPE metode, najčešće se koriste kolonice Oasis. Kolona se prvo kondicionirala s metanolom, a zatim se filtrirani hidrolizat na nju stavio. Za ispiranje kolone koristila se 5 % otopina metanola u vodi, a eluat se skupio u tamnim bočicama s vijčanim čepovima kako bi ispario pri sobnoj temperaturi. U bočice s uzorkom dodao se 1 mL metanola i analizirani su pomoću HPLC uređaja s UV detekcijom. Rezultati su pokazali da koncentracija vitamina E u hrani za pse iznosi 191  $\mu\text{g/g}$ , za svinje 95  $\mu\text{g/g}$  i za perad 55  $\mu\text{g/g}$  [41].

Za određivanje vitamina E može se koristiti ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (engl. *Pressurized liquid extraction*, PLE). Metoda je uspješno primijenjena za određivanje  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferola u bademima, lješnjacima, orasima i sjemenkama suncokreta. PLE sustav sastoji se od ćelije za ekstrakciju u kojoj se nalaze crpke i toplinski grijači kako bi se održavali svi parametri tijekom ekstrakcije. U ćeliji za ekstrakciju dodano je oko 1 g uzorka, a ostatak je nadopunjujen adsorbensom (Hydromatrix Celine). Ekstrakcija se provodila 5 minuta pri temperaturi od 50°C i tlaku od 1600 psi (1 psi = 6894,76 Pa), a kao otapalo se koristio acetonitril. Dobiveni su vrlo čisti ekstrakti koji su injektirani u tekućinski kromatograf s kulometrijskom detekcijom. Granice detekcije za  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ -tokoferol iznosile su 12  $\mu\text{g/L}$ , 9,5  $\mu\text{g/L}$  i 10  $\mu\text{g/L}$ , a iskorištenje je bilo u rasponu od 82% do 110% [42].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

- metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- KOH, (Gram-mol, Hrvatska)
- BHT, 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol 99 % (Acros Organics, Njemačka),
- n-heksan, HPLC čistoće (Carlo Erba, Francuska)
- etil acetat, (Fisher Scientific, UK)
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, bezvodni, (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- 2-propanol, HPLC čistoće (Fisher Chemical, UK).

#### 3.2. Pribor i instrumentacija

##### 3.2.1. Pribor

- kiveta za centrifugu (PP) 50 mL,
- staklene epruvete 50 mL,
- pipeta trbušasta 10 mL, 5 mL,
- mikropipeta 100-1000 µL,
- Vialica za HPLC 1,5 mL (tamno staklo).

##### 3.2.2. Instrumentacija

- analitička vaga
- laboratorijska tresilica
- sustav za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju Sonoplus 3100 (Bandelin)
- sonda za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju, model VS 70 T (Bandelin), (Slika 8)
- magnetska miješalica sa grijačem
- centrifuga

- tekućinski kromatograf visoke razlučivosti (Shimadzu, Japan),
- kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Shimadzu, Japan).



Slika 8. Sonda za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju, model VS 70 T (Bandelin).

### 3.3. Uzorci za analizu

Uzorci za analizu su svrstani u četiri skupine i prikazani su u tablici 1:

**Tablica 1.** Prikupljeni uzorci hrane i njihove oznake

| skupina  | oznaka uzorka |
|--|---------------|
| hrana dostupna na tržištu                      | H1            |
|  | H2            |
|  | H3            |
| hrana s dodanim uljima                         | HU1           |
| hrana s dodatkom drugih nutracina              | HSe           |
|  | HLu           |
| hrana s dodatkom vitamina E i drugih nutracina | Q1            |
|  | Q2            |
|  | Q3            |
|  | Q4            |
|  | Q5            |

Uzorci hrane za nesilice su nakon prikupljanja čuvani u hladnjaku na 4 °C.

#### 3.3.1. Sastav uzoraka hrane

Hrana dostupna na tržištu – hrana bez dodanih nutracina.

Hrana s dodanim uljima – u hranu su u različitom omjeru dodana ulja repice i lana te riblje ulje.

Hrana s dodatkom drugih nutracina – u hranu dostupnu na tržištu dodani su selen (HSe) i lutein (HLu).

Hrana s dodatkom vitamina E i vitamina E i drugih nutricina – u uzorke hrane dodan je vitamin E i drugi nutricini (Se, Lutein, omega-3 masne kiseline i ulja).

Za sve uzorke hrane koncentracija vitamina E određivat će se u tri paralelno pripremljena uzorka.

### 3.4. Odabir postupka ekstrakcije

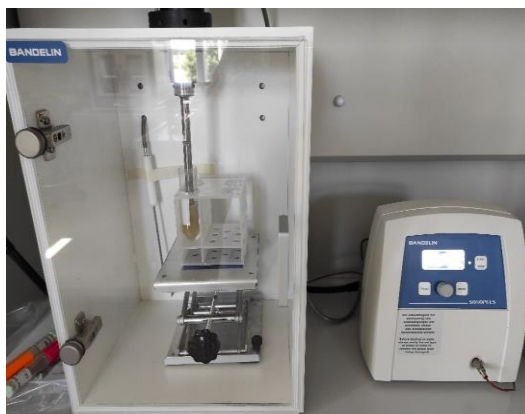
Kriteriji za odabir postupka ekstrakcije su kratko vrijeme ekstrakcije i točnost. Usporedit će se ekstrakcija čvrsto-tekuće potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija uz prethodnu saponifikaciju.

#### 3.4.1. Direktna ekstrakcija metanolom

Prema literaturi vitamin E ekstrahiran je iz zrna riže metanolom [43] pa ćemo iz hrane za nesilice vitamin E ekstrahirati tako da odvažemo 5 g uzorka hrane, dodati 1 mL 0,2 % otopine BHT i 9 mL metanola (Slika 9). Smjesu izmiješati pomoću tresilice 30 sekundi i ostaviti 1 sat da stoji na tamnom mjestu. Nakon stajanja, smjesu centrifugirati 15 minuta na 10 000 g, supernatant prenijeti u HPLC vialicu i pokrenuti analizu. Ovaj postupak ekstrakcije ponoviti uz direktnu ultrazvučnu ekstrakciju (Slika 10).



Slika 9. Smjesa hrane za nesilice, otopina BHT i metanol.



Slika 10. Uređaj za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju.

Radi lakšeg imenovanja u tablicama, ovaj postupak ekstrakcije označit će se kao ekstrakcija 1, odnosno ekstrakcija 1 + UVZS.

Parametri za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju:

Uređaj: Sonoplus 3100 (Bandelin)

Sonda: VS 70 T

Amplituda: 70 %

Interval ultrazvuka: 3 s

Interval pauze: 2 s

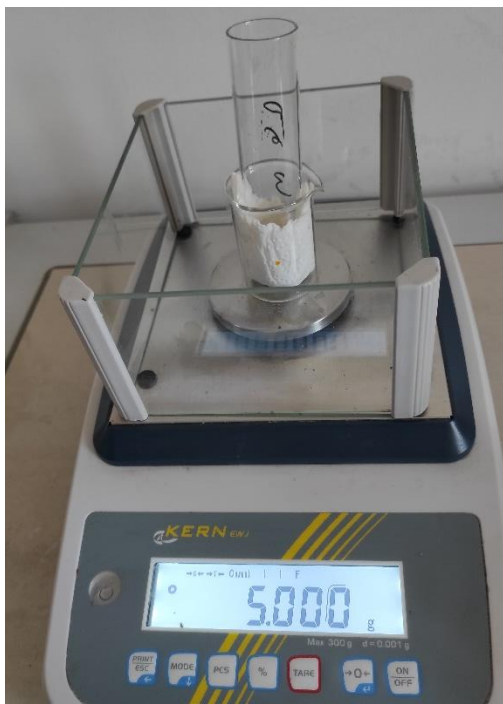
Ukupno vrijeme: 10 min.

#### 3.4.2. Ekstrakcija uz prethodnu saponifikaciju

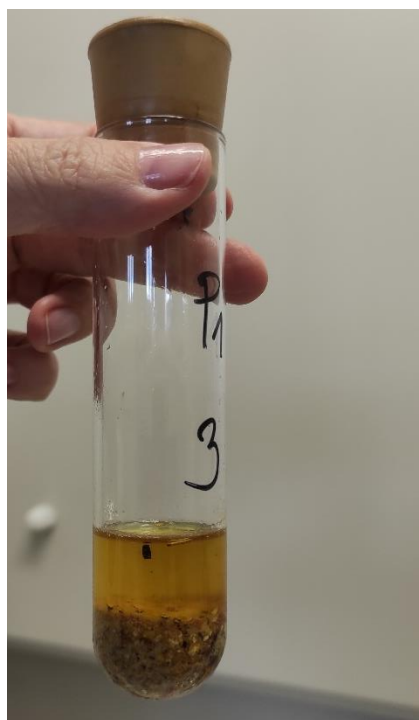
Postupak ekstrakcije je modificirana metoda Lim et al. [44]. U staklenu epruvetu od 50 mL odvagati 5 g uzorka hrane (Slika 11), dodati 5 mL 0,2% metanolne otopine BHT, 5 mL destilirane vode i 5 mL 40 % otopine KOH u metanolu (Slika 12). Smjesu izmiješati na tresilici 30 sekundi i zagrijavati 20 minuta u vodenoj kupelji na 50 °C (Slika 13). Nakon zagrijavanja, smjesu ohladiti (Slika 14) na sobnu temperaturu i dodati 10 mL smjese heksan : etilacetat = 85:15. Smjesu ponovo promiješati na laboratorijskoj tresilici i ostaviti da se slojevi odijele. Gornji, organski sloj (Slika 15), prenijeti u bočicu i dodati bezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Dio ovako osušenog organskog sloja profiltrirati kroz filter za špricu 0,45 μm i prenijeti u HPLC vialicu i analizirati (Slika 16).



Radi lakšeg imenovanja u tablicama, ovaj postupak ekstrakcije označit će se kao ekstrakcija 2.



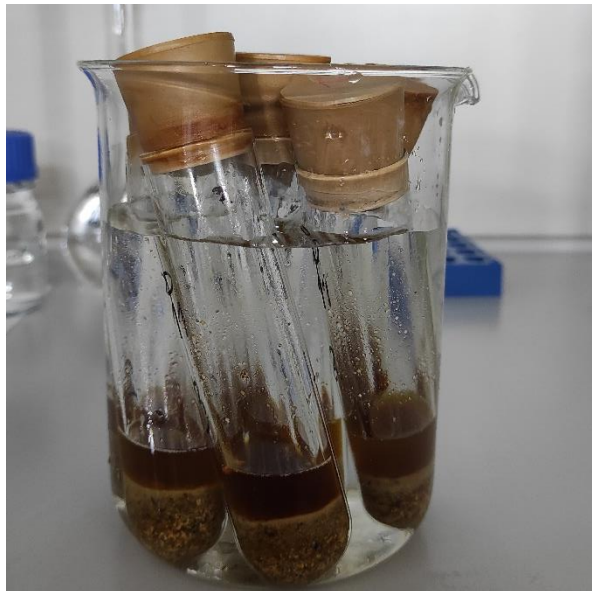
Slika 11. Vaganje uzorka hrane.



Slika 12. Smjesa uzorka hrane, metanolne otopine BHT, destilirane vode i otopine KOH u metanolu.



Slika 13. Zagrijavanje smjese u vodenoj kupelji.



Slika 14. Hlađenje smjese pri sobnoj temperaturi.



Slika 15. Odvajanje organskog sloja od vodenog sloja.



Slika 16. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti.

### 3.5. Provjera postupka ekstrakcije

Nakon odabira postupka ekstrakcije, provest će se provjera prikladnosti na način da se najprije izmjeri apsorbanija standarda vitamina E odabrane koncentracije, zatim se izmjeri apsorbanija uzorka pripremljenog odabranim postupkom ekstrakcije i na kraju se izmjeri apsorbanija uzorka sa dodanim standardom koji je pripremljen odabranim postupkom ekstrakcije.

### 3.6. Parametri analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

- Mobilna faza: isopropanol:metanol = 45:55
- Protok: 0,7 mL/min
- Temperatura: sobna temperatura
- Vrijeme analize: 10 min
- Detektor: UV-VIS, valna duljina: 295 nm
- Injektiran volumen: 20 µL
- Kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), Shimadzu
- Vrijeme zadržavanja: 4,7 minuta

### 3.6. Ispitivanje stabilnosti uzoraka

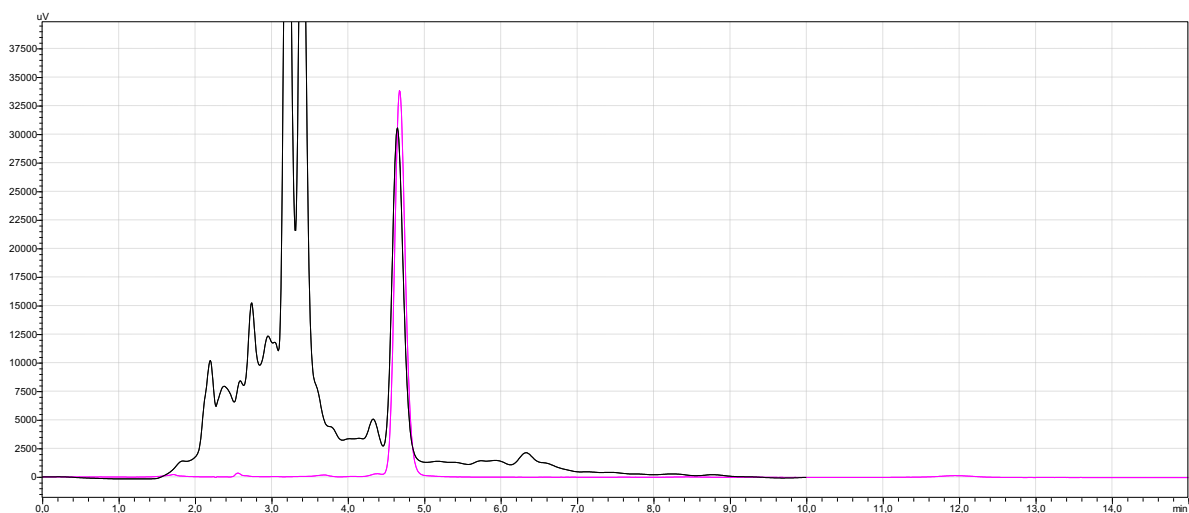
Nakon odabira postupka ekstrakcije, potrebno je ispitati stabilnost uzoraka. Stabilnost će se ispitati na način da istim uzorcima izmjerimo koncentraciju odmah nakon pripreme uzoraka, nakon 24 sata i nakon nekoliko dana.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

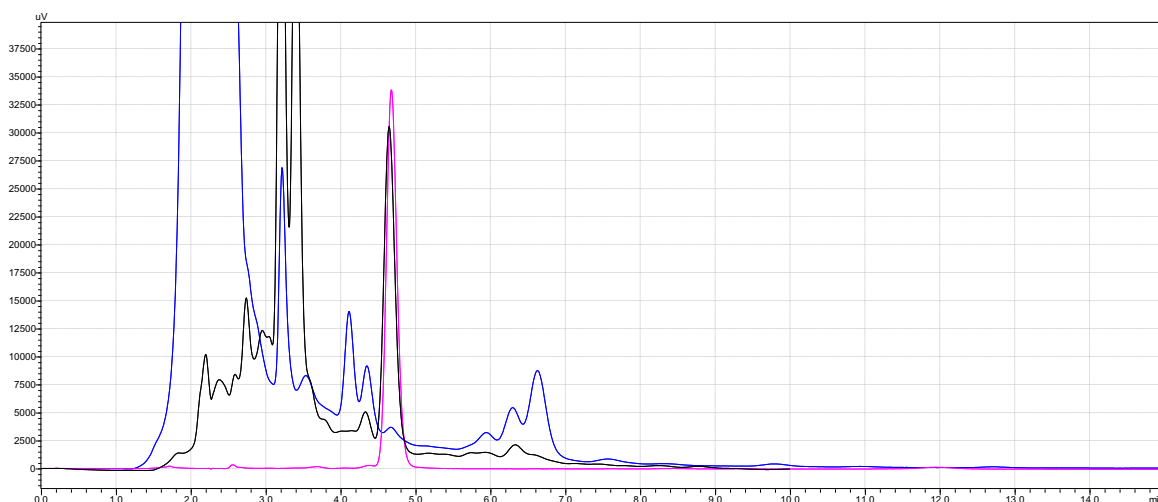
### 4.1. Odabir postupka ekstrakcije

Prema ranije opisanom postupku uspoređena su tri načina ekstrakcije: ekstrakcija 1, ekstrakcija 1 + UVZS i ekstrakcija 2.

Nakon HPLC analize uzoraka pripremljenih prema postupku ekstrakcije 1 dobivene vrijednosti unutar skupine uzoraka jako su se razlikovale. Zatim se ispitalo može li upotreba ultrazvuka dati bolje rezultate, no isti problem se pojavio i kod ovog načina ekstrakcije. Problem na koji se naišlo posljedica je kako kompleksne prirode uzorka tako i loše ekstrakcije vitamina E iz uzorka. Kako je vitamin E, vitamin topiv u mastima, a postupcima ekstrakcije 1 i ekstrakcije 1 + UZVS iz uzorka nisu izdvojene masti pa tako ni sav vitamin E, pa su rezultati dobiveni HPLC analizom značajno manji i neujednačeni. Na slikama 17 i 18 prikazani su kromatogrami na kojima se vidi razlika između uzoraka pripremljenih postupkom ekstrakcije 1 + UVZS i ekstrakcije 2. Zbog navedenog za ekstrakciju vitamina E odabrana je ekstrakcija 2.



Slika 17. Usporedba kromatograma dobivenih nakon pripreme uzoraka prema postupku ekstrakcija 2 ( uzorak - , standard - ).



Slika 18. Usporedba kromatograma dobivenih nakon pripreme uzoraka prema postupku ekstrakcija 2 i ekstrakcija 1+UVZS ( uzorak - , standard - , uzorak pripremljen postupkom ekstrakcija 1+UVZS -).

#### 4.2. Provjera postupka ekstrakcije

Prema ranije opisanom postupku provedena je provjera postupka ekstrakcije. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2. Iskorištenje (eng. *recovery*) ukazuje na prikladnost odabrane metode ekstrakcije.

**Tablica 2.** Vrijednosti dobivene provjerom postupka ekstrakcije.

| uzorak             | površina | mg/L    |
|--------------------|----------|---------|
| standard 0,1 mg/mL | 222172   | 110,961 |
| uzorak             | 289920   | 144,782 |
| uzorak + standard  | 497006   | 248,162 |
| teoretski          | 512092   | 255,743 |
| iskorištenje %     | 97,05    | 97,04   |

#### 4.3. Ispitivanje stabilnosti uzoraka

Nakon ekstrakcije i određivanja koncentracije vitamina E u uzorcima ispitana je stabilnost uzoraka mjerenjem koncentracije u istim uzorcima nakon 24 sata i 5 dana. Prema rezultatima prikazanim u tablici 3 vidljivo je da se koncentracija vitamina E nije značajno promijenila pa se uzorci mogu pripremiti ranije i analizirati kasnije. U ovom istraživanju svi uzorci hrane analizirani su odmah nakon pripreme uzoraka za analizu.

**Tablica 3.** Koncentracije vitamina E određene nakon pripreme uzorka, nakon 24 sata i nakon 5 dana.

| vrijeme analize (dan)           | uzorak |             |         |             |         |             |
|---------------------------------|--------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|
|                                 | 1      |             | 2       |             | 3       |             |
|                                 | mg/L   | mg/kg hrane | mg/L    | mg/kg hrane | mg/L    | mg/kg hrane |
| 0                               | 48,245 | 241,225     | 101,674 | 508,370     | 103,961 | 519,805     |
| 1                               | 47,786 | 238,930     | 100,764 | 503,820     | 103,344 | 516,720     |
| 5                               | 44,141 | 220,705     | 100,584 | 502,920     | 105,871 | 529,355     |
| <b>srednja vrijednost</b>       | 46,724 | 233,620     | 101,007 | 505,037     | 104,392 | 521,960     |
| <b>SD</b>                       | 2,249  | 11,243      | 0,584   | 2,922       | 1,317   | 6,587       |
| <b>RSD %</b>                    | 4,813  | 4,813       | 0,578   | 0,578       | 1,262   | 1,262       |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 2,545  | 12,723      | 0,661   | 3,306       | 1,491   | 7,454       |

#### 4.4. Analiza uzoraka hrane

##### 4.4.1. Hrana dostupna na tržištu

Analizirana su tri uzorka hrane za nesilice koji su dostupni na tržištu. Rezultati HPLC analize prikazani su u tablici 4. Najmanju koncentraciju vitamina E ima uzorak broj 3 (H3) kod kojeg je i najmanja vrijednost RSD (8,344 %) dok je najveća koncentracija ali i najveća vrijednost RSD kod uzorka 2 (H2) gdje je se koncentracija vitamina E kreće u rasponu od 182,16 – 512,82 mg/kg hrane što je razlika od 2,8 puta. Razlog ovako velikoj vrijednosti RSD kod H2 i velikoj razlici u izmjerenim koncentracijama uzoraka unutar iste skupine je u nehomogenosti samih uzoraka jer se hrana za nesilice priprema u velikim količinama a sam postupak miješanja smjese ne jamči homogenost smjese.

**Tablica 4.** Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice dostupnima na tržištu.

| uzorak | mg/L    | mg/kg hrane | srednja vrijednost mg/kg hrane | SD      | RSD (%) | interval pouzdanosti (±) |
|--------|---------|-------------|--------------------------------|---------|---------|--------------------------|
| H1.1   | 69,312  | 346,560     | 309,773                        | 31,998  | 10,329  | 36,208                   |
| H1.2   | 58,873  | 294,365     |                                |         |         |                          |
| H1.3   | 57,679  | 288,395     |                                |         |         |                          |
| H2.1   | 36,432  | 182,160     | 363,437                        | 167,623 | 46,122  | 189,680                  |
| H2.2   | 79,065  | 395,325     |                                |         |         |                          |
| H2.3   | 102,565 | 512,825     |                                |         |         |                          |
| H3.1   | 30,164  | 150,820     | 161,332                        | 13,462  | 8,344   | 15,234                   |
| H3.2   | 35,301  | 176,505     |                                |         |         |                          |
| H3.3   | 31,334  | 156,670     |                                |         |         |                          |

#### 4.4.2. Hrana s dodanim uljima

Analizom hrane s dodanim uljima repice, lana i ribljeg ulja u različitim postocima dobiveni su rezultati prikazani u tablici 5. I u ovim uzorcima je kao i kod prethodnih velika razlika u izmjenjenim koncentracijama unutar skupine na što ukazuje i velika vrijednost RSD. Razlika između najmanje i najveće koncentracije je 211 %.

**Tablica 5.** Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice s dodanim uljima.

| uzorak | mg/L    | mg/kg hrane | srednja vrijednost<br>mg/kg hrane | SD      | RSD (%) | interval<br>pouzdanosti<br>(±) |
|--------|---------|-------------|-----------------------------------|---------|---------|--------------------------------|
| U1     | 136,785 | 683,925     | 923,673                           | 427,167 | 46,247  | 483,376                        |
| U2     | 134,047 | 670,235     |                                   |         |         |                                |
| U3     | 283,372 | 1416,86     |                                   |         |         |                                |

#### 4.4.3. Hrana s dodatkom drugih nutracina

Dodatak nutracina kao što su selen i luteina nisu utjecali na koncentraciju vitamina E u hrani za nesilice. Rezultati dobiveni analizom prikazani su u tablici 6. Izračunata srednja vrijednost mg/kg hrane dvostruko je veća kod uzoraka s dodatkom luteina kod kojih je i RSD vrijednost prihvatljive vrijednosti (manje od 5 %).

**Tablica 6.** Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice s dodanim drugim nutracinima.

| uzorak | mg/L   | mg/kg hrane | srednja vrijednost<br>mg/kg hrane | SD     | RSD (%) | interval<br>pouzdanosti<br>(±) |
|--------|--------|-------------|-----------------------------------|--------|---------|--------------------------------|
| HSe_1  | 39,119 | 195,595     | 193,242                           | 81,605 | 42,230  | 92,344                         |
| HSe_2  | 22,097 | 110,485     |                                   |        |         |                                |
| HSe_3  | 54,729 | 273,645     |                                   |        |         |                                |
| HLut_1 | 78,279 | 391,395     | 382,770                           | 12,835 | 3,353   | 14,524                         |
| HLut_2 | 73,604 | 368,020     |                                   |        |         |                                |
| HLut_3 | 77,779 | 388,895     |                                   |        |         |                                |



#### 4.4.4. Hrana s dodatkom vitamina E i drugih nutracina i ulja

U tablici 7 uspoređene su koncentracije 5 uzoraka hrane za nesilice u koje je dodan vitamin E ili vitamin E i drugi nutracini. Najveća koncentracija 725,94 mg/kg hrane je u uzorcima Q4 no homogeni uzorci su uzorci skupine Q2 gdje je RSD vrijednost 2,9 %. Srednje vrijednosti ove skupine uzoraka manje su od srednje vrijednosti U skupine koja iznosi 923,67 mg/kg hrane, ali veće su od prosječnih vrijednosti ostalih skupina pa se može zaključiti da je dodatkom vitamina E u hranu za nesilice značajno povećana njegova koncentracija u hrani za nesilice zbog čega će jaja koka nesilica koje se hrane ovakvom vrstom hrane dati jaja bogata vitaminom E.

**Tablica 7.** Rezultati dobiveni analizom uzoraka hrane za nesilice s dodanim vitamina E i vitamina E i drugih nutracina.

| uzorak | mg/L    | mg/kg hrane | srednja vrijednost<br>mg/kg hrane | SD      | RSD (%) | interval<br>pouzdanosti<br>(±) |
|--------|---------|-------------|-----------------------------------|---------|---------|--------------------------------|
| Q1.1   | 48,245  | 241,225     | 423,133                           | 157,641 | 37,256  | 178,384                        |
| Q1.2   | 101,674 | 508,370     |                                   |         |         |                                |
| Q1.3   | 103,961 | 519,805     |                                   |         |         |                                |
| Q2.1   | 114,306 | 571,530     | 555,110                           | 16,138  | 2,907   | 18,261                         |
| Q2.2   | 110,906 | 554,530     |                                   |         |         |                                |
| Q2.3   | 107,854 | 539,270     |                                   |         |         |                                |
| Q3.1   | 93,706  | 468,530     | 647,003                           | 186,353 | 28,802  | 210,874                        |
| Q3.2   | 126,427 | 632,135     |                                   |         |         |                                |
| Q3.3   | 168,069 | 840,345     |                                   |         |         |                                |
| Q4.1   | 135,092 | 675,460     | 725,940                           | 149,777 | 20,632  | 169,486                        |
| Q4.2   | 121,585 | 607,925     |                                   |         |         |                                |
| Q4.3   | 178,887 | 894,435     |                                   |         |         |                                |
| Q5.1   | 83,329  | 416,645     | 483,207                           | 67,687  | 14,008  | 76,593                         |
| Q5.2   | 96,202  | 481,010     |                                   |         |         |                                |
| Q5.3   | 110,393 | 551,965     |                                   |         |         |                                |

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je koncentracija vitamina E u hrani za nesilice koja ima različiti sastav. Za ekstrakciju vitamina E koristile su se tri različite metode: direktna ekstrakcija metanolom, direktna ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija uz prethodnu saponifikaciju. Direktnom ekstrakcijom metanolom i direktnom ultrazvučnom ekstrakcijom nisu dobiveni pouzdani rezultati jer se iz uzorka nisu mogle izdvojiti masti pa tako ni sav vitamin E. Ekstrakcija uz prethodnu saponifikaciju pokazala se najpouzdanijom metodom za određivanje vitamina E, a njezino iskorištenje od 97,04% ukazuje na prikladnost odabrane metode ekstrakcije.

Vitamin E određivan je u 4 skupine: 3 uzorka iz hrane koja je dostupna na tržištu, 1 uzorak iz hrane s dodanim uljima, 2 uzorka iz hrane s dodatkom drugih nutracina i 5 uzoraka iz hrane s dodatkom vitamina E i drugih nutracina i ulja. Koncentracija vitamina E u hrani za nesilice određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

Najveća koncentracija vitamina E je u hrani s dodatkom vitamina E i drugih nutracina i ulja i iznosi 725,94 mg/kg hrane. Najveća koncentracija vitamina E u hrani dostupnoj na tržištu iznosi 363,437 mg/kg hrane, a u hrani s dodanim uljima najveća koncentracija vitamina E iznosi 923,673 mg/kg hrane. Rezultati HPLC analize u hrani dostupnoj na tržištu i hrani s dodanim uljima ukazuju na velike razlike u koncentracijama i veliki RSD unutar skupine zbog nehomogenosti uzoraka jer se hrana za nesilice priprema u velikim količinama, a miješanje smjese ne garantira homogenost smjese. U hrani s dodatkom drugih nutracina (seleno i luteina), najmanja koncentracija vitamina E određena je u uzorku hrane sa selenom i iznosi 193,242 mg/kg hrane.

Stabilnost uzoraka ispitana je mjerenjem koncentracije u istim uzorcima nakon 24 sata i 5 dana. Rezultati su pokazali da se koncentracija vitamina E nije značajno promijenila pa se uzorci mogu pripremiti ranije i analizirati kasnije.

Najveća koncentracija vitamina E je u hrani s dodatkom vitamina E i drugih nutracina i ulja pa se može zaključiti da dodatkom vitamina E u hrani za nesilice dolazi do povećanja njegove koncentracije u hrani za nesilice, ali i jajima koje daju nesilice koje jedu hranu obogaćenu nutracinima i uljima.

## 6. LITERATURA

- [1] Ashwell M., Bussell G., Clasen L., Egginton J., Gibson S., Govindji A., McClenaghan J., Wilcock F., Vodič kroz vitamine, minerale i dodatke prehrani, Ma-tisk d.o.o., Maribor, 2008.
- [2] Combs G. F., McClung J. P., The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health, Fifth edition, 2017.
- [3] <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/> [10.7.2021.]
- [4] <https://nemecpharmacia.hr/prepoznajte-nedostatak-vitamina-tijelu/> [10.7.2021.]
- [5] Eitenmiller R., Lee J., Vitamin E: Food Chemistry, Composition and Analysis, Marcel Dekker Inc, New York, 2004.
- [6] Mindell E., Vitaminska biblija za 21. stoljeće, Mozaik knjiga, Zagreb, 2001.
- [7] Rizvi S., Raza S. T., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S., Mahdi F., The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases, 14(2) (2014) 157-165.
- [8] Szymanska R, Nowicka B., Trela A., Kruk J., Molecular Nutrition: Vitamins, Elsevier Inc, 2020.
- [9] <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/tokoferoli-i-tokotrienoli/> [13.7.2021.]
- [10] Singh V. K., Beattie L. A., Seed T. M., Vitamin E: tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures, Journal of Radiation Research, 54(6) (2013) 973-988.
- [11] <https://www.plantagea.hr/zbirka-tekstova/antioksidansi-vitamin-e-kompleks/>  
[13.7.2021]
- [12] <https://www.krenizdravo.hr/ljepota/njega-lica/ulje-vitamina-e-za-lice-za-sto-sve-koristi>  
[14.7.2021]
- [13] <https://www.organicnet.co/magazine/u-kojoj-hrani-se-skriva-vitamin-e> [15.7.2021]
- [14] Kralik G., Has-Schön E., Kralik D., Šperanda M., Peradarstvo: Biološki i zootehnički principi, Grafika Osijek, 2008.
- [15] <https://body.ba/ishrana/nutricionizam/prepoznajte-simptome-nedostatka-vitamina-e/7520> [17.7.2021]

- [16] Kralik Z., Jelić S., Dizajnirana jaja i njihova nutritivna svojstva, Pregledni znanstveni članak, 2017.
- [17] <https://www.agroklub.com/baza-stocarstva/peradarstvo/> [18.7.2021]
- [18] <https://www.agroklub.com/stocarstvo/hranidba-peradi-do-vrhunca-nesivosti/32838/> [18.7.2021]
- [19] <https://hr.farmerstvo.net/1938878-proper-feeding-of-laying-hens-at-home> [20.7.2021]
- [20] <https://hor.prosadguru.ru/%C5%BEivotinje/stoka/36656-nedostatak-e-vitamina-utje%C4%8De-na-reproduktivne.html> [22.7.2021.]
- [21] Vučemilo M., Higijena i bioekologija u peradarstvu, Intergrafika d.o.o., Zagreb, 2008.
- [22] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34154> [25.7.2021]
- [23] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [24] Nollet L. M. L., Food Authenticity and Traceability: High pressure liquid chromatography (HPLC) in food authentication, Woodhead Publishing Limited, 2003.
- [25] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) [27.7.2021]
- [26] [https://www.iopan.pl/BioChem/equipment\\_pl.html](https://www.iopan.pl/BioChem/equipment_pl.html) [28.7.2021]
- [27] Weston A, Brown P. R., HPLC and CE: Principles and Practice, Elsevier Inc, 1997.
- [28] <https://www.slideshare.net/arghasen90/detectors-used-in-hplc> [29.7.2021]
- [29] Kumar K., Yadav A. N., Kumar V., Vyas P., Dhaliwal H. S., Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, Bioresources and Bioprocessing, 4(1) (2017) 18.
- [30] Capelo-Martinez J-L., Ultrasound in Chemistry, WILEY-VCH, Weinheim, 2009.
- [31] Drmić H., Režek Jambrak A., Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croat J. Food Sci. Tehnol., 2(2) (2010) 22-33.
- [32] <https://www.festta.hr/proizvod/ultrazvucna-kupka-model-1f-c100/> [29.7.2021]

- [33] McMurray C. H., Blanchflower W. J., Determination of  $\alpha$ -tocopherol in animal feedstuffs using high-performance liquid chromatography with spectrofluorescence detection, *Journal of Chromatography*, 176 (1979) 488-492
- [34] McMurray C. H., Blanchflower W. J., Rice D. A., Influence of Extraction Techniques on Determination of  $\alpha$ -Tocopherol in Animal Feedstuffs, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (Vol. 63, No. 6, 1980)
- [35] Qian H., Sheng M., Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D<sub>2</sub> in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis, *Journal of Chromatography A*, 825 (1998) 127-133
- [36] Cohen H., Lapointe M. R., Determination of Vitamin E in Animal Feeds by Normal Phase High Pressure Liquid Chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* (Vol. 63, No. 6, 1980)
- [37] Pinheiro-Sant Ana H. M., Guinazi M., da Silva Oliveira D., Della Lucija C. M., de Lazzari Reis B., Cardoso Brandao S. C., Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 8496-8502
- [38] Sookwong P., Nakagawa K., Murata K., Kojima Y., Miyazawa T., Quantitation of Tocotrienol and Tocopherol in Various Rice Brans, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 461-466
- [39] Indyk H. E., Simplified Saponification Procedure for the Routine Determination of Total Vitamin E in Dairy Products, Foods and Tissues by High-performance Liquid Chromatography, *Analyst* (Vol. 133, 1988)
- [40] Kmostak S., Rapid Determination of Supplemental Vitamin E Acetate in Feed Premixes by Capillary Gas Chromatography, *J. Of AOAC International* (Vol 76, No. 4, 1993)
- [41] Fedder R., Ploger A., Solid-Phase Extraction of Vitamins A and E from Animal Feeds: A Substitute for Liquid-Liquid Extraction, *Journal of AOAC International* (Vol. 88, No. 6, 2005)
- [42] Delgado-Zamareno M.M., Bustamante-Rangel M., Sanchez-Perez A., Carabis-Martinez R., Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts, *Journal of Chromatography A*, 1056 (2004) 249-252

[43] Chen M.-H., Bergman C. J., A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and  $\gamma$ -oryzanol contents, *Journal of Food Composition and Analysis* 18 (2005) 139-151

[44] Lim H., Woo S., Kim H.-S., Jong S.-K., Lee J., Comparison of extraction methods for determining tocopherols in soybeans, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 1124-1127

## 7. ŽIVOTOPIS

**Renata Dončić**

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Odjel za kemiju**

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

### **Osobni podatci:**

Adresa: Cvjetkova ulica 4, 31000 Osijek

e-pošta: [renatadoncic@gmail.com](mailto:renatadoncic@gmail.com)

Datum i mjesto rođenja: 25.10.1997., Vinkovci

### **Obrazovanje:**

2019. – 2021. Sveučilišni diplomski studij na Odjelu za kemiju; istraživački smjer, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2020. – 2021. Program pedagoško – psihološka i didaktičko – metodička izobrazba, Fakultet za odgojne i obrazovne znanosti u Osijeku

2016. – 2019. Sveučilišni preddiplomski studij na Odjelu za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2012. – 2016. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2004. – 2012. Osnovna škola Vođinci

### **Ostale aktivnosti:**

27.2.2021. First conference of European clean energy transition

6.3.2021. Online projekt „Ms or Mrs? Dr.“

18.3.2021. Webinar „Mehanokemijske reakcije“