

# Određivanje vitamina E u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

---

**Nikolić, Marija Elena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:667298>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**

*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Marija Elena Nikolić**

**Određivanje vitamina E u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Marija Elena Nikolić**

**Određivanje vitamina E u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima**

**Diplomski rad**

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

**Osijek, 2020.**

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Odjel za kemiju  
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer  
Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija

## ODREĐIVANJE VITAMINA E U JAJIMA OBOGAĆENIM FUNKCIONALNIM SASTOJCIMA

Marija Elena Nikolić

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku

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

### Sažetak:

Vitamin E je vitamin topiv u mastima i izvrstan je biološki antioksidans. Izuzetno je važan za čovjekovo zdravlje te je ključan dodatak hrani za životinje zbog jačanja imunološkog statusa, poboljšanja kvalitete hrane i na taj način povećavanja unosa vitamina E u organizam čovjeka. Cilj ovog istraživanja bio je tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti odrediti sadržaj vitamina E u jajima dobivenim od nesilica koje su hranjene krmnim smjesama obogaćenim funkcionalnim sastojcima. Određivana je koncentracija vitamina E u jajima dobivenim od nesilica hranjenih standardnom krmnom smjesom, u jajima dobivenim od nesilica hranjenih smjesom s dodatkom vitamina E, komercijalno dostupnim jajima te jajima dobivenim od nesilica s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava. Analizirani su pripremljeni uzorci žumanjaka i izmjerene su vrijednosti koncentracija vitamina E. Najveća koncentracija vitamina E, u odnosu na literaturne podatke, izmjerena je u skupini jaja nesilica čija je prehrana bila obogaćena vitaminom E. Nešto niža koncentracija izmjerena je u jajima nesilica s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava koje su hranjene raznolikom hranom. Prosječna vrijednost vitamina E u jajima nesilica hranjenih standardnom krmnom smjesom iznosila je 34 % manje u odnosu na literaturne podatke. Najniža koncentracija izmjerena je u komercijalno dostupnim jajima. Prosječna vrijednost je bila znatno manja u odnosu na literaturne podatke i na podatke izmjerenih vrijednosti ostalih skupina. Usporedbom podataka vidljivo je da će dodatak vitamina E u hranu nesilica povećati njegov sadržaj u jajima. Također je vidljivo da sadržaj vitamina E u jajima ovisi o hrani kojom su nesilice hranjene.

**Diplomski rad obuhvaća:** stranica: 38, slika: 23, tablica: 10, literaturnih navoda: 28

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** vitamin E, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti, nutricini

**Rad prihvaćen:** 1. rujna 2020.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc. dr. sc. Olivera Galović, mentorica i članica
3. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, članica
4. doc. dr. sc. Tomislav Balić, zamjenik člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

---

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Chemistry**  
**Graduate University Study of Chemistry; research study**  
**Scientific Area: Natural Sciences**  
**Scientific Field: Chemistry**

**DETERMINATION OF VITAMIN E IN EGGS ENRICHED WITH FUNCTIONAL  
INGREDIENTS**

**Marija Elena Nikolić**

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

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

**Abstract:**

Vitamin E is a fat-soluble vitamin and is an excellent biological antioxidant. It is extremely important for human health and is a key additive to animal feed due to the strengthening the immune status, improving food quality and thus increasing the intake of vitamin E in the human body. The aim of this study was to determine the content of vitamin E in eggs obtained from laying hens fed with feed mixtures enriched with functional ingredients using high-resolution liquid chromatography. The concentration of vitamin E was determined in eggs obtained from laying hens fed with a standard feed mixture, in eggs obtained from laying hens fed with feed mixture enriched with vitamin E, commercially available eggs and eggs obtained from laying hens from family farms. The prepared yolk samples were analyzed and the values of vitamin E concentrations were measured. The highest concentration of vitamin E, compared to the literature data, was measured in the group of laying eggs whose diet was enriched with vitamin E. Slightly lower concentration was measured in eggs obtained from family farms where hens are fed with variety of foods. The average value of vitamin E in laying hens fed with standard feed mixture was 34% lower compared to literature data. The lowest concentration was measured in commercially available eggs. The average value was significantly lower in relation to the data found in literature and to the data of measured values of other groups. A comparison of the obtained data showed that the addition of vitamin E to the feed of laying hens will increase its content in eggs. It is also evident that the content of vitamin E in eggs depends on the food on which the laying hens are fed.

**Thesis includes:** *pages: 38, figures: 23, tables: 10, references: 28*

**Original in:** Croatian

**Keywords:** vitamin E, high-resolution liquid chromatography, nutrices

**Thesis accepted:** 1 September 2020

**Reviewers:**

1. Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof., president
2. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof., mentor and member
3. Martina Medvidović-Kosanović, Ph.D., assistant prof., member
4. Tomislav Balić, Ph.D., assistant prof., alternate member

**Thesis deposited in:** Library 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. VITAMIN E .....	2
2.1. Fizikalna i kemijska svojstva vitamina E .....	2
2.2. Antioksidacijska aktivnost vitamina E .....	3
2.3. Metabolizam vitamina E .....	4
2.3.1. Oksidacija kromanolnog prstena.....	5
2.3.2. Oksidacija fitilnog pobočnog lanca.....	5
2.4. Način unosa i doziranje vitamina E .....	6
2.5. Vitamin E u hrani.....	6
2.6. Vitamin E – dodatak prehrani .....	7
2.7. Istraživanja vezana uz vitamin E .....	8
3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE RAZLUČIVOSTI (HPLC) .....	12
3.1. HPLC uređaj, dijelovi i njihova zadaća .....	13
3.2. Princip rada HPLC .....	14
3.3. Opasnosti i mjere opreza.....	14
4. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
4.1. Reagensi.....	15
4.2. Instrumentacija.....	15
4.3. Analizirani uzorci .....	15
4.4. Postupak.....	16
4.4.1. Priprema uzorka za analizu .....	16
4.4.2. Priprema HPLC za analizu.....	18
4.4.3. Kalibracija HPLC .....	19
4.4.4. Provjera odabrane metode za određivanje sadržaja vitamina E.....	20
4.4.5. Izračunavanje sadržaja vitamina E u uzorcima .....	20
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
5.1. Konstruiranje kalibracijskog pravca .....	22
5.2. Provjera metode odabrane za određivanje sadržaja vitamina E.....	24
5.3. Određivanje koncentracije vitamina E u jajima.....	25
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. LITERATURA .....	35

8. ŽIVOTOPIS .....	37
--------------------	----



## 1. UVOD

Vitamin E je vitamin topljiv u mastima i od velike je važnosti za čovjekovo zdravlje. Navodi se kao izvrstan biološki antioksidans koji razbija lančanu reakciju oksidacije lipoproteina male gustoće (engl. *Low density lipoprotein*, LDL) te štiti stanice i tkiva od lipoperoksidativnog oštećenja izazvanog slobodnim radikalima. Pojavljuje se u obliku tokoferola i tokotrienola, pod zajedničkim nazivom tokokromanoli, a uzima se hranom koja sadrži masti. Tijelo ga može pohraniti pa ga nije nužno konzumirati svaki dan. Dobar izvor vitamina E su biljna ulja, orašasti plodovi i sjemenke orašastih ulja, žumanjak, margarin, sir soja, pšenica, klice, zobene pahuljice, avokado, masline, zeleno povrće i brojni drugi izvori. Tokoferoli prevladavaju u maslinama, suncokretovom i kukuruznom ulju te soji, dok su tokotrienoli glavne komponente vitamina E palminog ulja, ječma i riže. Biološki najaktivniji oblik vitamina E je  $\alpha$ -tokoferol. Zbog svog izrazitog antioksidativnog djelovanja, sudjeluje u sprječavanju raznih oblika bolesti [1, 2].

Upotreba pojma „vitamin E“ preporučuje se kao generički opisnik za sve tokole i derivate tokotrienola koji kvalitetno pokazuju biološku aktivnost  $\alpha$ -tokoferola. Pojam tokoferol odnosi se na metil-supstituirane derivate tokola i nisu sinonim za pojam vitamin E. Prirodni tokokromanoli sastoje se od dvije homologne serije: tokoferoli sa zasićenim bočnim lancem i tokotrienoli s nezasićenim bočnim lancem. Homolozi vitamina E, tokokromanoli, s najvećom difuzijom u prirodi, su četiri tokoferola i četiri tokotrienola:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferoli i  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tokotrienoli. Tokoferoli i tokotrienoli imaju istu osnovnu kemijsku strukturu, karakteriziranu dugačkim lancem pričvršćenim u položaju 2 kromanskog prstena. Tokotrienoli se razlikuju od tokoferola jer sadrže farnezil, a ne zasićeni izoprenoidni C<sub>16</sub> bočni lanac [1].

Metoda pogodna za analizu te određivanje vitamina E u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima je tekućinska kromatografija visoke razlučivosti. Tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti određuje se vitamin E u jajima dobivenim od nesilica koje su hranjene krmnim smjesama obogaćenim funkcionalnim sastojcima. Koriste se pogodna mobilna faza te stacionarna faza za izvođenje kromatografije te se samim tim izvodi pod za to određenim uvjetima [2].

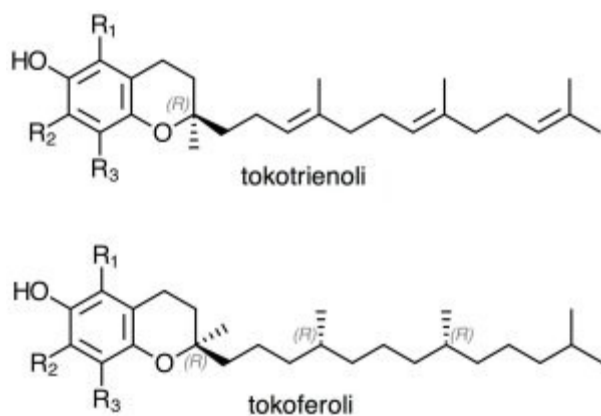
## 2. VITAMIN E

Vitamin E je vitamin topljiv u mastima i neophodan je za zdravlje čovjeka. Tijelo ga može pohraniti pa vitamin E ne treba konzumirati svakodnevno. Vitamin E posjeduje izrazitu antioksidativnu aktivnost te se javlja u osam kemijskih oblika: tokoferoli (alfa, beta, gama i delta) te tokotrienoli (alfa, beta, gama i delta). Antioksidativno djelovanje vitamina sprječava stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koji nastaju oksidacijom masti. Vitamin E ima značajnu ulogu u zaštiti masti od oksidacije u lipoproteinima niske gustoće te smanjuje rizik od razvoja bolesti. Tokoferoli mogu također pružiti zdravstvene koristi uglavnom u prevenciji karcinoma i koronarnih bolesti tako da ugradnja vitamina E u jaje može povećati oksidacijsku stabilnost i pružiti izvor tokoferola koji su korisni za prehranu i zdravlje ljudi. Vitamin E uključen je u hranu za životinje zbog jačanja imunološkog statusa, poboljšanja kvalitete hrane i na taj način povećavanja unosa vitamina E u organizam čovjeka [1, 2, 3].

### 2.1. Fizikalna i kemijska svojstva vitamina E

Vitamin E je naziv za skupinu spojeva koji se nazivaju tokokromanoli, a čine ga četiri tokoferola i četiri tokotrienola (Slika 1). Tokoferol se odnosi na derivate tokola supstituirane metilnom skupinom i nije sinonim za pojam vitamin E. Tokoferoli i tokotrienoli imaju istu osnovnu kemijsku strukturu, okarakteriziranu dugačkim lancem pričvršćenim na drugoj poziciji kromanolnog prstena [4, 5].

Tokoferoli i tokotrienoli su derivati kroman-6-ola s jednom do tri metilne skupine na aromatskom prstenu te zasićenim (tokoferoli) ili nezasićenim (tokotrienoli) izoprenoidnim lancem. Prirodni tokoferoli su optički aktivne tvari, a sintetički tokoferoli su racemati [4, 5].



Slika 1. Struktura tokoferola i tokotrienola [6].

Biosinteza tokoferola se odvija samo u fotosintetskim organizmima, odnosno u unutarnjoj membrani kloroplasta. Na taj se način fotosintetski uređaji mogu zaštititi od toksičnosti kisika i peroksidacije lipida. Enzim tokoferol-ciklaza identificiran je kao ključni enzim biosinteze tokoferola. Homogentizat je poznat kao aromatski prekursor u biosintezi tokoferola u kloroplastima. Nakon sinteze homogentizata plastidnim šikimatnim putem, tirozin se pretvara u 4–hidroksifenilpiruvat pomoću tirozin-aminotransferaze. Na temelju sličnosti, identificirana je i eksperimentalno potvrđena enzimska aktivnost za AtTAT1 (TAT7) i AtTAT2 gen u genomu Arabidopsis. Gen TAT7, lokaliziran u citoplazmi, kontrolira 35 – 50 % biosinteze tokoferola u listovima. Sinteza tokoferola iz listova u potpunosti ovisi o katabolizmu klorofila te recikliranju fitola [4, 5, 7].

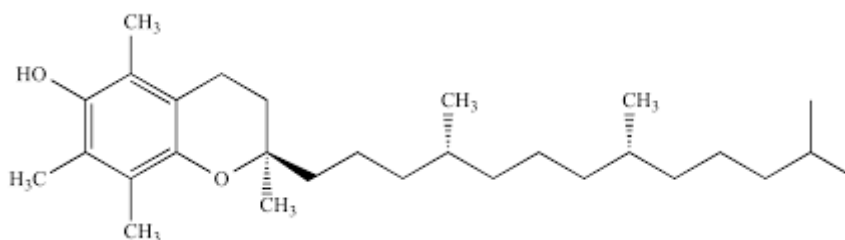
Vitamin E dobro je topljiv u mastima, uljima te nepolarnim otapalima, dok je slabo topljiv u acetonu i etanolu te je potpuno netopljiv u vodi. Vitamin oksidira s kisikom iz zraka, postojan je na vidljivom svjetlu, a nestabilan je pod ultraljubičastim zračenjem. Pri sobnoj temperaturi, vitamin E je svijetlo žuto viskozno ulje [4, 5].

## 2.2. Antioksidacijska aktivnost vitamina E

Tokokromanoli su najučinkovitija skupina lipofilnih fenolnih antioksidansa. Prema istraživanjima, antioksidansi štite ključne komponente stanice, neutraliziranjem slobodnih radikala prije no što dođe do oksidacije lipida ili oštećenja DNA. Smanjenjem napada

slobodnih radikala, antioksidansi razbijaju lanac reakcija peroksidacije lipida i zatim štite staničnu membranu popravkom i zamijenom lipida. Na taj način mogu spriječiti rak te kardiovaskularne bolesti. Epidemiološki dokazi upućuju na to da antioksidansi dobiveni iz prehrane, kao što je vitamin E, mogu biti važni za održavanje zdravlja i ljudi i životinja [1, 4, 5].

Najnovija istraživanja pokazala su da tokotrienoli imaju specifičnu ulogu koja nadilazi njihove okvire poznatog antioksidativnog djelovanja vitamina E. Epidemiološki dokazi pokazali su da su visoke koncentracije vitamina E u plazmi povezane s manjim rizikom od kardiovaskularnih bolesti i nekim oblicima karcinoma. U nasumičnom, kontroliranom ispitivanju utvrđen je učinak mješavine  $\alpha$ - ,  $\beta$ - ,  $\gamma$ - and  $\delta$ - tokotrienola i  $\alpha$ - tokoferola (Slika 2) na oštećenju DNA, što se smatra ciljanim spojem u procesu oksidacije. Dobiveni rezultati sugeriraju da je dodatak vitamina E smjesi, smanjio razinu oštećenja DNA kod zdravih ispitanika [1].



Slika 2. Prikaz strukture najčešćeg oblika vitamina E,  $\alpha$ - tokoferola [8].

### 2.3. Metabolizam vitamina E

Vitamin E se apsorbira u tankom crijevu, pasivnom difuzijom, iz biljnih i životinjskih izvora gdje se neesterificirani oblik vitamina apsorbira odmah, a esterificirani se oblik enzimski pretvara u alfa tokoferol pa se potom apsorbira. Apsorpciji pomažu sokovi žuči i gušterače jer otapaju vitamin E te su samim tim važni za stvaranje micela, nakon čega otpuštaju svoj sadržaj u enterocite. Vitamin E se u stanicama nalazi u slobodnom i vezanom obliku, a skladišti se u adipoznom tkivu, jetri i mišićima [5, 9].

Vitamin E se preko limfnog sustava i krvotoka prevodi do jetre pomoću hilomikrona. Jetra izlučuje lipoproteine (LDL, HDL, engl. *High density lipoprotein*) za

koje se veže vitamin E te se prenosi do tkiva. Cijeli je proces, prijenosa tokoferola iz lipoproteina u periferna tkiva, potaknut enzimom lipoprotein lipazom [5, 9].

Dva su načina kojima se vitamin E metabolizira u organizmu, a to su oksidacija kromanolnog prstena te oksidacija pobočnog fitilnog lanca [5].

### **2.3.1. Oksidacija kromanolnog prstena**

Oksidacijom  $\alpha$ -tokoferola nastaje  $\alpha$ -tokoferil-kinon. Reakcijom tokoferoksil radikala sa peroksil radikalom započinje otvaranje prstena, nakon što  $\alpha$ -tokoferol završi antioksidativnu funkciju. Indikatori, da vitamin E djeluje kao antioksidans, su Simonovi metaboliti. Simonovi metaboliti su poznati produkti  $\alpha$ -tokoferola, odnosno  $\alpha$ -tokoferonička kiselina, njen lakton te  $\alpha$ -tokoferonolakton. Pomoću NAD(P)H mikrosomalnih i mitohondrijskih enzima,  $\alpha$ -tokoferol se može reducirati do  $\alpha$ -tokoferil hidrokinona. Dolazi do njihova izlučivanja urinom ili fecesom, u obliku sulfata ili glukuronida [5].

### **2.3.2. Oksidacija fitilnog pobočnog lanca**

Karboksietilhidroksikromani (CEHC), prema novijim istraživanjima, predstavljeni su kao metaboliti vitamina E, topljivi u vodi s netaknutim kromanolnim prstenom. Njihovo izlučivanje je povećano pri povišenim razinama vitamina E. Netaknut kromanolni prsten je znak da vitamin E nije djelovao kao antioksidans. Nastaju oksidacijom pobočnog lanca uz citokrom P450 hidroksilaze. Koraci koji slijede u katabolizmu su  $\beta$ -hidroksilacija krajnje metilne skupine fitilnog pobočnog lanca u 13-hidroksikromanol te zatim dehidrogenacija u kroman-13-ol i gubitak fitilnog pobočnog lanca [5].

## 2.4. Način unosa i doziranje vitamina E

Vitamin E apsorbira se zajedno s lipidima te ga je potrebno uzimati uz obrok koji sadrži dovoljnu količinu masti, kako bi se zajamčila optimalna bioraspoloživost. Kada se  $\alpha$ -tokoferol primjenjuje u obliku acetata mora se hidrolizirati esterazama u crijevu. Aktivnost esteraza može varirati među pojedincima te dodatno zakomplicirati složeno pitanje bioraspoloživosti. Preporučeni dnevni unos vitamina E za oba spola iznosi 15 mg. Konzumacija namirnica obogaćenih funkcionalnim sastojcima, odnosno vitaminom E, osigurava oko 60 % dnevnih potreba za istim vitaminom. Povećana razina vitamina E u namirnicama povoljno utječe na održavanje kvalitete i svježine tijekom skladištenja [3, 10].

## 2.5. Vitamin E u hrani

Vitamin E, odnosno svih osam oblika vitamina E, pojavljuje se u hrani u različitim količinama. Oblik vitamina E, koje tijelo može najbolje iskoristiti i čija je dostupnost najveća, naziva se  $\alpha$ -tokoferol. Jaja se navode kao dobar izvor vitamina E, uz različite orašaste plodove, pšenične klice, palmino i ricinusovo ulje, avokado, kivi, kupine te zeleno lisnato povrće poput kelja i špinata (Slika 3). Vitamin E se može pronaći i u životinjskim organima, jetri i bubrezima te u biljnim tkivima zajedno s karotenoidima i nezasićenim masnim kiselinama [5].



Slika 3. Namirnice bogate vitaminom E [11].

## 2.6. Vitamin E – dodatak prehrani

Vitamin E, kao dodatak prehrani, prisutan je u obliku estera,  $\alpha$ -tokoferil acetata te  $\alpha$ -tokoferil sukcinata koji je prisutan u znatno manjim količinama. Esteri su prisutni u tekućem obliku, obliku kapsula te u prahu koji se može miješati s vodom. Namirnice koje se obogaćuju su žitarice te mlijeko u prahu. Vitamin E se također koristi kao dodatak hrani za nesilice i u krmnim smjesama jer ih stabilizira zbog antioksidativnog djelovanja. Samim tim, jaja i ostali produkti se obogaćuju funkcionalnim sastojcima poput vitamina, luteina, selena i dr. Dodatak vitamina E u hrani nesilica povećat će njegov sadržaj u jajima. Prema istraživanjima, utvrđen je porast sadržaja  $\alpha$ -tokoferola u žumanjcima u grupi koja je u hrani dobivala  $\alpha$ -tokoferil acetat, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 4) [3, 5].

Vitamin E je osjetljiv na svjetlost i toplinu pa se raspada ako je izložen kuhanju, pečenju, pirjanju te drugim načinima obrade i skladištenja hrane. Kako bi se spriječio gubitak vitamina, od velike je važnosti čuvati ulja i orašaste plodove u zatvorenim posudama, dalje od sunčeve svjetlosti, topline i vlage [5].



Slika 4. Jaja obogaćena vitaminom E [12].

## 2.7. Istraživanja vezana uz vitamin E

Dosadašnja istraživanja rezultirala su razvojem brojnih metoda za određivanje vitamina E. Korišteni su razni postupci prilikom pripreme uzoraka pogodnih za analizu određenom metodom. Proučene su mnoge analize od kojih neke zahtijevaju preciznost, iskustvo, a neke su jednostavnije i manje osjetljive.

Razvijena je i ocijenjena pojednostavljena metoda za određivanje koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u goveđem mišiću. Metoda se sastoji od koraka saponifikacije primijenjenog na 1 g uzorka svježeg mišića, nakon čega slijedi pojedinačna ekstrakcija izooktana saponificiranih uzoraka. U epruveti je izvagan 1 g svježeg uzorka, dodana je askorbinska kiselina te 7,3 mL prethodno pripremljene otopine za saponifikaciju. Uzorak se miješa dok se askorbinska kiselina ne otopi. Askorbinska se kiselina dodaje kako bi se spriječilo uništavanje  $\alpha$ -tokoferola alkalnom otopinom. Uzorci se inkubiraju te se potom hlade i u svaku se epruvetu dodaje 4 mL izooktana. Precizno odvajanje vodene faze i faze izooktana odvijaju se spontano u 1 minuti, dok je  $\alpha$ -tokoferol u ekstraktu razdvojen normalnom faznom kromatografijom te kvantificiran fluorescencijskom detekcijom. Uzorak se analizira na tekućinskom kromatografu visoke razlučivosti pod zadanim uvjetima [13].

Za kvantitativno određivanje vitamina E razvijena je spektrofotometrijska metoda. Analiza se temelji na redukciji Mo (VI) u Mo (V) pomoću uzorka analita. Metoda je optimizirana i karakterizirana u odnosu na interval linearnosti, ponavljanje, obnovljivost te molarni apsorpcijski koeficijent, prilikom čega se kvantificira vitamin E. Rezultati dobiveni predloženom metodom validirani su usporedbom sa standardnom HPLC metodom. Uzorci sjemena zamrznuti su tekućim dušikom i usitnjeni do finog praha. Dodan je volumen otapala, a suspenzija je homogenizirana, premještena u polipropilenske posude te se miješa 1 sat na sobnoj temperaturi i u mraku. Po potrebi je ekstrakcijsko otapalo dopunjeno BHT-om. Poslije centrifugiranja supernatant je prebačen u nove posude pri čemu se pelet ponovno suspendira i homogenizira u drugom volumenu te centrifugira još jednom. Supernatanti se spoje i čuvaju na 4 °C dok se ne analiziraju na spektrofotometru. Provedena su i spektrofotometrijska mjerenja te su dobivene vrijednosti apsorbanције varirale u rasponu 0,15 do 0,85 [14].

Kolorimetrijska metoda određivanja tokoferola temelji se na smanjenju afiniteta tokoferola prema željeznom kloridu. Oksidacija tokoferola pomoću željezova klorida, u



prisutnosti  $\alpha$ -dipiridila u alkoholnoj otopini je brza i potpuna. Sol željeza koja nastaje redukcijom određuje se kolorimetrijski s  $\alpha$ -dipiridilom (slične obojene soli nastaju s  $\alpha$ -dipiridilom i o-fenantrolinom). Metoda je brza i jednostavna te omogućuje određivanje malih količina tokoferola. Tokoferol se određivao u uljima, prilikom čega se izvodila saponifikacija ulja s metil alkoholnim kalijevim hidroksidom pri temperaturi ključanja tijekom 10 minuta u atmosferi dušika. Smjesa je razrijeđena metanolom i vodom te ekstrahirana tri puta s čistim eterom. Spojeni ekstrakti se ispiru vodom te se suše pomoću kalcijevog klorida, uparavaju u atmosferi ugljikovog dioksida te se dodaje u odgovarajuću količinu etanola. Količine tokoferola koje su određene navedenom metodom, varirale su od 0,1 mg do 0,4 mg [15].

Razvijena je i potvrđena metoda za mjerenje vitamina E u masnom tkivu i mliječnoj žlijezdi štakora. Tkiva su homogenizirana u etanolu i vodi i ekstrahirana s n-heksanom. Vitamin K1 korišten je kao unutarnji standard. Razdvajanje je provedeno pomoću tekućinskog kromatografa visoke razlučivosti (HPLC) pri čemu se kao mobilna faza koristila smjesa metanol:voda (96,5:3,5). Detekcija je fluorescencija s ekscitacijom na 295 nm i emisijom na 350 nm. Nakon prikupljanja, tkiva štakora su smještena u tekući dušik i držana do dana analize. Izvavano je 50 mg masnog tkiva i homogenizirano s etanolom i vodom. U prethodno određenu količinu vitamina K1 dodan je homogenat tkiva. Smjesa je ekstrahirana dva puta s n-heksanom te je uslijedilo centrifugiranje. Supernatanti su sakupljeni zajedno i upareni do suha. Ostatak je ponovno otopljen u smjesi kloroform-metanol. Standardi i ekstrakti tkiva provjereni su na linearnost dajući koeficijente korelacije preko 0,99 u rasponu koncentracija od 0,56 - 4,51 nmol / g u masnom tkivu i od 2,18 - 17,4 nmol / g u tkivu mliječne žlijezde [16].

Opisana je jednostavna i pouzdana metoda za istodobno određivanje svih osam homologa vitamina E u pilećem mesu tekućinskom kromatografijom s fluorescencijskom detekcijom. Svi analiti, uključujući interni standard ( $\alpha$ -tokoferol acetat), eluirani su u roku od 35 minuta i detektirani su pomoću native fluorescencije (pobuda na 395 nm te emisija na 330 nm). Kromatografija, uz uporabu eluensa na bazi heksana na stupcu silikagela, uključivala je početni korak kondicioniranja kolone da se spriječi nepovratna adsorpcija tokoferola i tokotrienola. Najniže razine  $\alpha$ -tokoferola,  $\gamma$ -tokoferola,  $\alpha$ -tokotrienola,  $\beta$ -tokotrienola,  $\gamma$ -tokotrienola and  $\delta$ -tokotrienola bile su: (0,73; 0,86; 1,0; 1,2; 1,7 i 1,3) ng [17].

Cilj rada bio je utvrditi mogu li se negativni učinci visoke temperature okoliša, na proizvodnju jaja i kvalitetu jaja, ublažiti prehranbenim vitaminom E. Prepelice su se hranile bazalnom prehranom dopunjenom  $\alpha$ -tokoferil acetatom pod određenim uvjetima. Kompozitni uzorci su sušeni 48 sati, zatim mljeveni te podvrgnuti kemijskoj analizi (korišten je 1 g uzorka). Iz svake skupine prepelica prikupljeno je 10 jaja za mjerenje. Jaja su kuhana 15 minuta, žumanjak je odvojen od bjelanjka, izvagani su, a potom su se mjerile koncentracije željeza, cinka, bakra i mangana na specifičnim valnim duljinama za svaki element korištenjem atomskog apsorpcijskog spektrometra. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se suplementacijska prehrana, s 250 mg  $\alpha$  – tokoferol acetata, može smatrati zaštitnom praksom u prehrani prepelica, smanjujući negativne učinke toplinskog stresa [18].

Opisana je brza metoda za ekstrakciju i određivanje vitamina E u ljudskom urinu. Razvijena je metoda direktne ekstrakcije i rutinske analize metabolita vitamina E,  $\gamma$ - i  $\alpha$  – karboksietil hidroksikromana, iz ljudske mokraće. Upotrebljava se relativno mali volumen uzorka (5 mL), a nakon enzimske hidrolize konjugiranih oblika i zakiseljavanja, metaboliti se ekstrahiraju s dietil-eterom. Iz urina je uzet volumen od 5 mL te dodan interni standard troloksa (30 mg za plinsku kromatografiju te 10 mg za tekućinsku kromatografiju visoke razlučivosti). Potom je dodana enzimaska otopina te je uslijedila inkubacija. Nakon hlađenja, uzorci su zakiseljeni dodatkom HCl. Provedena je ekstrakcija metabolita s dietil eterom te centrifugiranje. Uzorci su analizirani plinskom kromatografijom te tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti s elektrokemijskom detekcijom. Otkriveno je da HPLC analiza daje veću selektivnost i veću osjetljivost u usporedbi s plinskom kromatografijom. Granica detekcije HPLC metode iznosila je  $10^{-14}$  mol dm<sup>-3</sup>, a linearnost je postignuta u rasponu od ( $4 \times 10^{-14}$  do  $2 \times 10^{-13}$ ) mol dm<sup>-3</sup> [19].

Razrađena je modificirana plazma metoda (ICP, Quaipe i Harris) određivanja tokoferola u mlijeku. Količine mlijeka i etanola u ekstrakcijskoj smjesi rasle su proporcionalno prema potrebi. Alikvot je ispario do suha pod dušikom, a ostatak se otopi u ukupnom volumenu od 10 mL etanol:cikloheksana (1:1). Potom se uzorci centrifugiraju, a 8 mL supernatanta je testirano. Za slijepu probu se uzima 8 mL otapala. Sadržaj vitamina E izračunava se iz podataka o umjeravanju dobivenih otopinom čistog, prirodnog tokoferola otopljenog u etanol:ciklohesanu (1:1). Vrijednosti za navedene uzorke su u rasponu od 0,08 do 0,15 mg tokoferola na 100 mL mlijeka [20].

U navedenom istraživanju predstavljena je nova kolorimetrijska metoda za procjenu vitamina E u krvnoj plazmi ili serumu. Cjelovita krv uzima se u epruvete te se centrifugira. 1 ili 2 mL seruma ili plazme i 0,5 mL 5 % natrijevog hidroksida se pipetira u epruvetu i dobro protrese kako bi se svi esteri vitamina E mogli saponificirati. Epruvete se ostave neko vrijeme nakon čega se otopina razrijedi s 10 mL destilirane vode, prebaci se u ljevak za odjeljivanje i ekstrahira dva puta s petroleterom. Ekstrakti se spoje i ispiru destiliranom vodom. Pod djelomičnim vakuumom otapalo se odstrani do suha. Ostatku se dodaje fosfomolibdenska kiselina te nakon toga pročišćeni etilni alkohol. Vrijednosti analiziranih uzoraka kreću se u rasponu od 0,361 - 0,412 mg u 100 mL [21].

Opisana je jednostavna, točna i osjetljiva metoda za određivanje mikro količine vitamina E u čistom obliku i u multivitaminским kapsulama. Metoda se temelji na redukciji plave tetrazolijeve boje u blagno lužnatom mediju, pomoću vitamina E, nakon ekstrakcije s vodenom otopinom EDTA s petroleterom i transesterifikacijom. Reakcije oksidacije i redukcije nastaju nakon 10 minuta zagrijavanja u vodenoj kupelji, što dovodi do stvaranja visoko obojanog formazanskog derivata. Tetrazolijeve soli korištene su za kolorimetrijsko određivanje kortikosteroida i modificiranih kortikosteroida. Korišten je i za određivanje spojeva koji imaju druge ketonske skupine koje mogu reducirati tetrazolijeve soli do visoko obojenog crvenog formazana. Mjerenja apsorbancije provedena su na 526 nm, a kalibracijski graf je bio linearan 0,2 – 11,0  $\mu\text{g/mL}$  s relativnom preciznošću od oko 0,7 – 1,5 % kada se koristi standardna metoda dodavanja [22].

U radu je ispitan utjecaj različitih oblika dijetalnog selena na vitamin E i na sadržaj žumanjka i pilećeg mesa pomoću tekućinskog kromatografa visoke razlučivosti. Jaja su skupljena od kokoši nesilica koje su podvrgnute različitim prehranbenim tretmanima. Tretmani su uspoređivali učinke anorganskih dodataka selena s učincima organskih dodataka. Prehranbeni dodaci selena povećali su udio  $\alpha$ -tokoferola u žumanjku s 297 mg/kg, suhe materije bez dodataka, na 311 mg/kg kada je selen dodan kao selenit, i na 370 – 375 mg/kg kada su korišteni organski dodaci. Uključivanje organskih prehranbenih izvora selena u prehranu nesilica, povećao bi prehranbene vrijednosti (vitamin E i selen) proizvoda za prehranu ljudi [23].

### 3. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE RAZLUČIVOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke razlučivosti je brza tehnika koja, s visokom preciznošću i specifičnošću, razdvaja smjese na pojedinačne sastojke (Slika 5). Koristeći HPLC kao rutinski postupak, metoda ima nekoliko prednosti: može biti potpuno automatizirana, čišćenje i priprema uzoraka su jednostavni, obnovljivost materijala za pakiranje znači da analitički uvjeti za novi stupac ostaju isti [24].

Na vrijeme zadržavanja i rezoluciju utječu karakteristike stupca i karakteristike ispiranja. Za mobilnu fazu HPLC otapalo je nepolaro (heksan, metilen klorid i dr.), a za stacionarnu fazu je polarno (silika). Molekule uzoraka su privučene česticama u koloni, za razliku od otapala. Manje polarne molekule, prve se eluiraju [24].

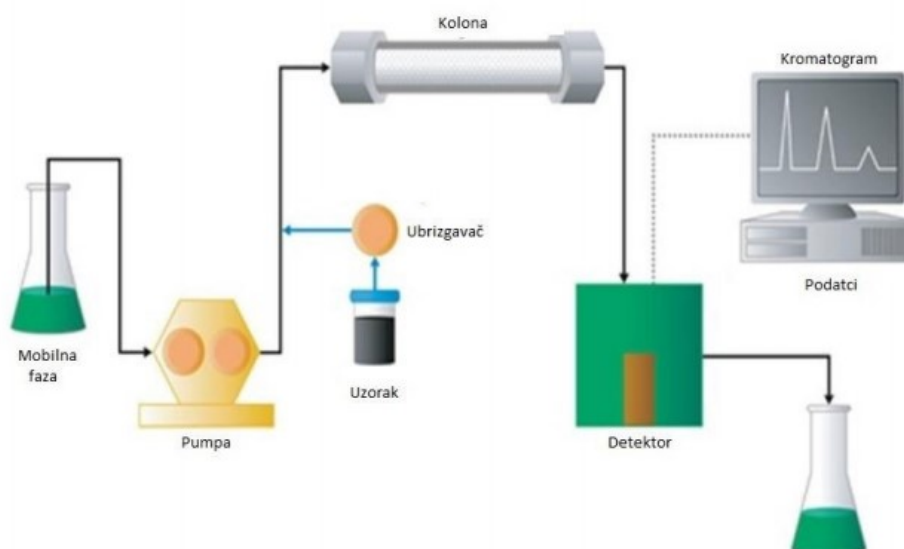
Primjene HPLC u prehrambenoj tehnologiji uključuju, s jedne strane, analitičko i kvantitativno ispitivanje sastava proizvoda, a s druge strane, osiguranje kvalitete proizvoda s povećanom produktivnošću. HPLC se koristi u prehrambenoj industriji za analizu komponenata i sirovih i prerađenih proizvoda. U novom prehrambenom proizvodu, neophodna je analiza sirovina, intermedijara i konačnih proizvoda. Od velike je važnosti slijediti i promjene tijekom obrade ili skladištenja. Hrana i piće mogu se testirati na kontaminantima ili aditivima, kako bi se mogli poštivati vladini propisi [24].



Slika 5. Prikaz uređaja tekućinske kromatografije visoke razlučivosti (HPLC) [25].

### 3.1. HPLC uređaj, dijelovi i njihova zadaća

HPLC uređaj, odnosno instrument za tekućinsku kromatografiju visoke razlučivosti pokazao se kao jedan od važnijih alata za različite dijelove industrije, uključujući petrokemiju, farmaceutske proizvode, prirodne znanosti i brojne druge. U dijelove HPLC uređaja pripadaju pumpa, ubrizgivač, kolona te detektor (Slika 6). HPLC generira pritisak pomoću pumpe tako što pumpa stvara pritisak na otapalo kako bi prošla kroz kolonu. Pumpe moraju biti konstruirane za veće tlakove koje generiraju. Zadaća ubrizgivača je uvođenje tekućeg uzorka u tok mobilne faze ručno ili pomoću autoinjektora sa što manjim poremećajima. Kolona odvaja komponente uzorka primjenom parametara, bilo fizikalnih ili kemijskih. Kolona je ispunjena sitnim kuglicama koje imaju afinitet prema kemikalijama koje se analiziraju te filter koji sprječava da kuglice napuste kolonu, ali omogućuje protjecanje otopine. Detektor je uređaj koji mjeri prisutnost pojedinih komponenti koje izlaze iz kolone te ih potom pretvara u električni signal koji se presnima u podatkovni sustav [26].



Slika 6. Dijelovi HPLC uređaja [26].

### **3.2. Princip rada HPLC**

Kada se uzorak pripremi, dolazi do direktnog ubrizgavanja zbog bolje preciznosti. Prije samog ubrizgavanja uzorka, mora biti odabran odgovarajući detektor koji može prepoznati tražene komponente tog uzorka dok se ispiru iz HPLC kolone. HPLC uređaj sadrži spremnik u kojem se nalazi otapalo za provedbu analize, odnosno mobilnu fazu. Visokotlačna pumpa koristi se za generiranje brzine protoka mobilne faze. Uzorak se ubrizgava pomoću ubrizgivača u struju mobilne faze koja nosi uzorak u HPLC kolonu. Kolona sadrži stacionarnu fazu koja omogućava separaciju, a potom detektor prepoznaje tražene elemente uzorka. Mobilna faza izlazi iz detektora i skuplja se u spremnik za otpad. Detektor je spojen s računalom te se bilježi električni signal potreban za generiranje kromatograma kako bi se identificirale te kvantificirale koncentracije sastojaka uzorka [26].

### **3.3. Opasnosti i mjere opreza**

Organska otapala, koja se koriste prilikom izvođenja analize, mogu biti opasna. Važno je izbjegavati udisanje para te dodir s kožom pri čemu se priprema uzoraka i priprema mobilne faze za tekućinsku kromatografiju visoke razlučivosti izvodi u za to propisanom mjestu, digestoru, uz propisane uvjete. Metanol je lako zapaljiva tekućina i para, uzrokuje oštećenja organa, a koristi se za mobilnu fazu i pripremu uzoraka. U svakom trenutku potrebno je nositi rukavice te zaštitne naočale. Tekući otpad mobilne faze, metanola i izopropanola, odlaze se u, za to, označenom spremniku za otpad. Važno je držati se propisanih sigurnosnih laboratorijskih postupaka [24].

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Reagensi

- metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- isopropanol, HPLC čistoće (Fisher Chemical, UK),
- 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), 99% (Acros Organics, Njemačka).

### 4.2. Instrumentacija

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

### 4.3. Analizirani uzorci

Analizirani su uzorci sedam skupina jaja te je u njima određen sadržaj vitamina E.

1. skupina (kontrolna skupina) – jaja dobivena od nesilica hranjenih standardnom krmnom smjesom,
2. i 3. skupina (jaja obogaćena vitaminom E) – jaja dobivena od nesilica hranjenih smjesom s dodatkom vitamina E (2. skupina) te krmnom smjesom s dodatkom vitamina E i drugih nutracija (3. skupina),
4. i 5. skupina (komercijalno dostupna jaja) – jaja dobivena od nesilica hranjenih krmnom smjesom nepoznatog sastava,
6. i 7. skupina – jaja dobivena od nesilica s dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva (OPG) hranjena raznolikom hranom.

## 4.4. Postupak

### 4.4.1. Priprema uzorka za analizu

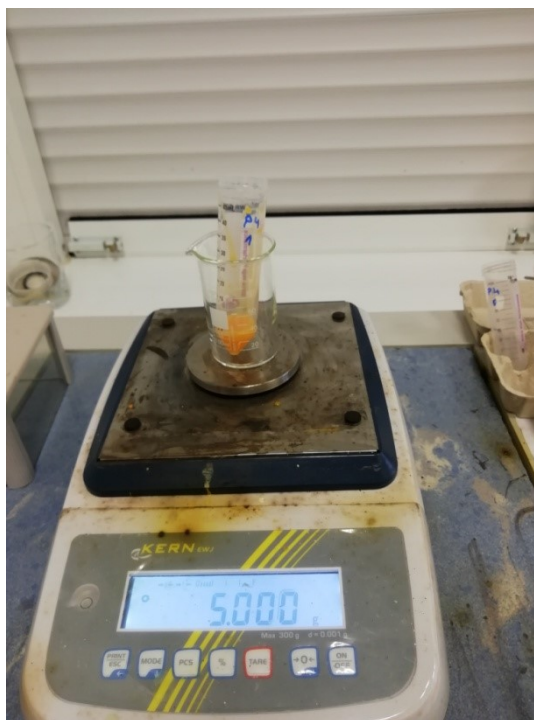
Prilikom pripreme uzorka, jaje je potrebno razdvojiti na bjelanjak i žumanjak pri čemu se razdvajanje izvodi ručno. Žumanjak se posuši na papirnatom ručniku te se prenosi u staklenu čašu (Slika 7) gdje se miješa staklenim štapićem te se na analitičkoj vagi oprezno, u epruvete, odvagane 5 g žumanjka (Slika 8). U epruvetu s uzorkom dodaje se 15 mL metanola te se dobro promiješa na vorteksu. Uzorcima se dodavao i stabilizator 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), kako se vitamin E ne bi tijekom vremena raspao. Uzorci se pohranjuju na tamnom mjestu u vremenskom periodu od 16 sati [27].

Nakon perioda pohrane, iz epruveta se supernatant presipa u čašu (Slika 9) te se potom supernatant profiltrira kroz filter 0,45  $\mu\text{m}$  u vijalice, nakon čega je uzorak spreman za analizu (Slika 10) [27].

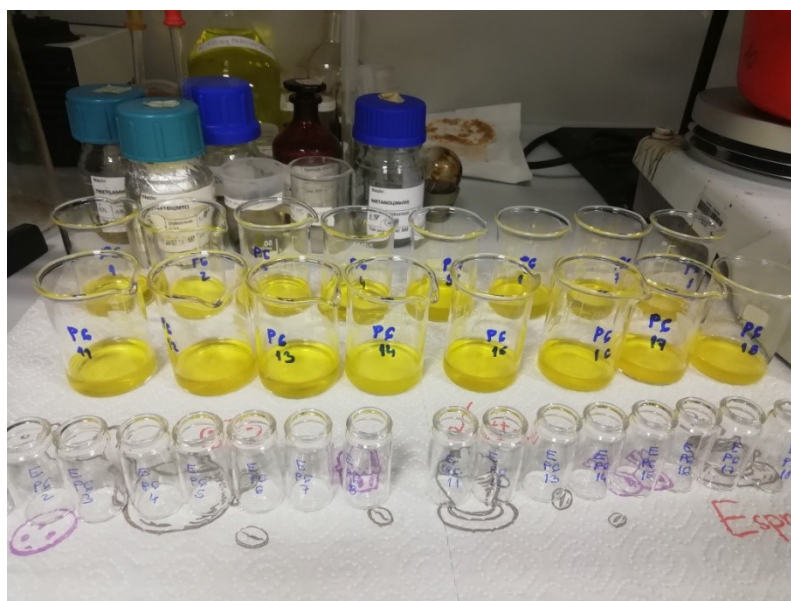


Slika 7. Razdvojeni uzorak žumanjka pripremljen za vaganje.





Slika 8. Vaganje uzorka žumanjka.



Slika 9. Supernatant u čaši.



Slika 10. Filtriranje supernatanta.

#### 4.4.2. Priprema HPLC za analizu

Za analizu uzoraka koristi se tekućinski kromatograf visoke razlučivosti sa Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) kolonom (Slika 11). Prije samog početka analize ispiru se cijeli HPLC sustav. Ispiranje započinje metanolom, a nastavlja mobilnom fazom, što je u ovom slučaju isopropanol:metanol = 45:55. Kada tlak postane stabilan, a bazna linija ravna, započinje se s analizom.

Uvjeti metode:

- Mobilna faza: isopropanol:metanol = 45:55
- Protok (flow rate): 1 mL/min
- Temperatura: sobna temperatura
- Vrijeme analize: 10 min
- Valna duljina: 295 nm (UV-VIS detektor)
- Injektiran volumen: 20  $\mu$ L
- Kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), Shimadzu
- Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme): 4,7 minuta



Slika 11. Tekućinski kromatograf visoke razlučivosti.

#### 4.4.3. Kalibracija HPLC

Kalibracija je postupak kojim se podešava instrument prema određenoj mjeri u cilju smanjenja sistemske pogreške. Tim se procesom mjere veličine čije su vrijednosti već poznate.

Pripremi se serija standardnih otopina od (0,005; 0,01; 0,02; 0,04; i 0,06) mg/mL odnosno (5, 10, 20, 40 i 60) mg/L. Navedeni standardi pripremljeni su razrjeđivanjem osnovne otopine koncentracije 1 mg/mL (0,01 g/10 mL metanola). Serije standardnih otopina razrijeđene su, tj. pripremljene korištenjem metanola.

Mjere se apsorbancije pripremljenih standardnih otopina čije su koncentracije poznate te se potom konstruira kalibracijski pravac. Kalibracijski pravac izrađuje se na način da se uvrste izmjerene apsorbancije u dijagram koji prikazuje ovisnost izmjerene apsorbancije i koncentracije serija standardnih otopina poznate koncentracije.

#### 4.4.4. Provjera odabrane metode za određivanje sadržaja vitamina E

Provjerom odabrane metode ocjenjujemo odgovara li odabrana metoda svrsi koju smo joj namijenili, mjerenju koncentracije vitamina E u uzorcima jaja.

Za provjeru metode pripreme se tri različita uzorka kojima se korištenjem odabrane metode izmjeri apsorbancija odnosno koncentracija vitamina E u uzorku.

Uzorci se pripreme na sljedeći način:

1. 500  $\mu$ L mobilne faze + 500  $\mu$ L standarda 0,02 mg/mL
2. 500  $\mu$ L mobilne faze + 500  $\mu$ L realnog uzorka
3. 500  $\mu$ L standarda 0,02 mg/mL + 500  $\mu$ L realnog uzorka

Zbroj izmjerenih apsorbancija, odnosno izmjerenih koncentracija uzoraka 1 i 2 treba biti jednak izmjerenoj apsorbanciji odnosno koncentraciji uzorka 2.

#### 4.4.5. Izračunavanje sadržaja vitamina E u uzorcima

Koncentracije dobivene mjerenjem uzoraka žumanjaka izražene su u vrijednostima mg/L. Zbog mogućnosti uspoređivanja s literaturnim podacima dobivene koncentracije je potrebno preračunati u mg vitamina E /100 g žumanjka.

Vrijednosti potrebne za izračun:

$$m(\text{žumanjka}) = 5,000 \text{ g}$$

$$V(\text{metanola koji se koristi za ekstrakciju}) = 15 \text{ mL}$$

$$V(\text{injektiranog uzorka}) = 20 \mu\text{L}$$

$m$  (vitamina E, rezultat HPLC analize)

$$m(\text{žumanjka u 1 mL metanola}) = \frac{m(\text{žumanjka})/\text{g}}{V(\text{metanola koji se koristi za ekstrakciju})/\text{mL}}$$

$$m(\text{žumanjka u 20 } \mu\text{L}) = \frac{m(\text{žumanjka u 1 mL metanola})/\text{g} \cdot V(\text{injektiranog uzorka})/\mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$m(\text{vitamina E u } 20 \mu\text{L}) = \frac{m(\text{rezultat HPLC analize})/\mu\text{g} \cdot 20 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$OMJER = \frac{m(\text{vitamina E u } 20 \mu\text{L})}{m(\text{žumanjka u } 20 \mu\text{L})} = m(\text{vitamina E})/\mu\text{g/g}$$

$$m(\text{vitamina E})/\mu\text{g/g} = \frac{m(\text{vitamina E})/\mu\text{g/g}}{1000}$$

$$m(\text{vitamina E})/\text{mg}/100 \text{ g} = (\text{vitamina E})/\text{mg/g} \cdot 100$$

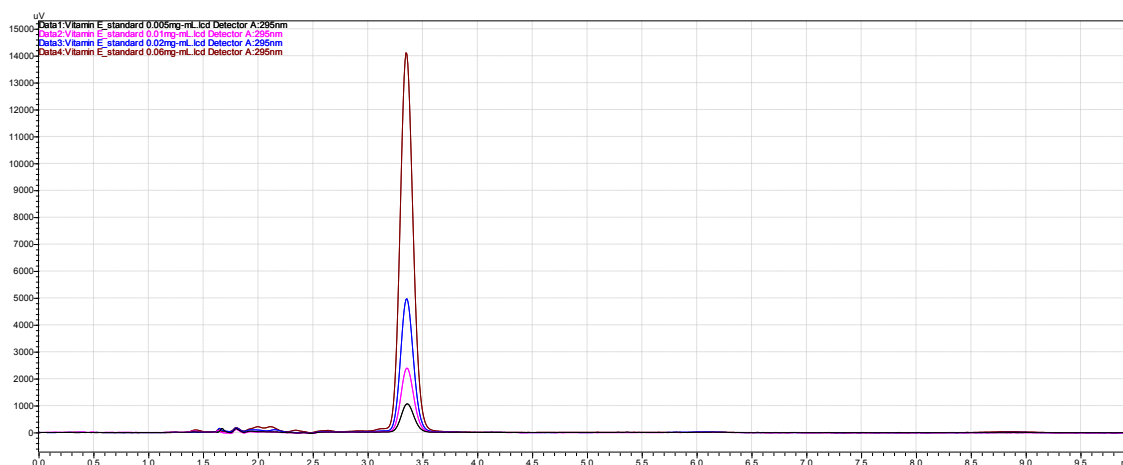
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Konstruiranje kalibracijskog pravca

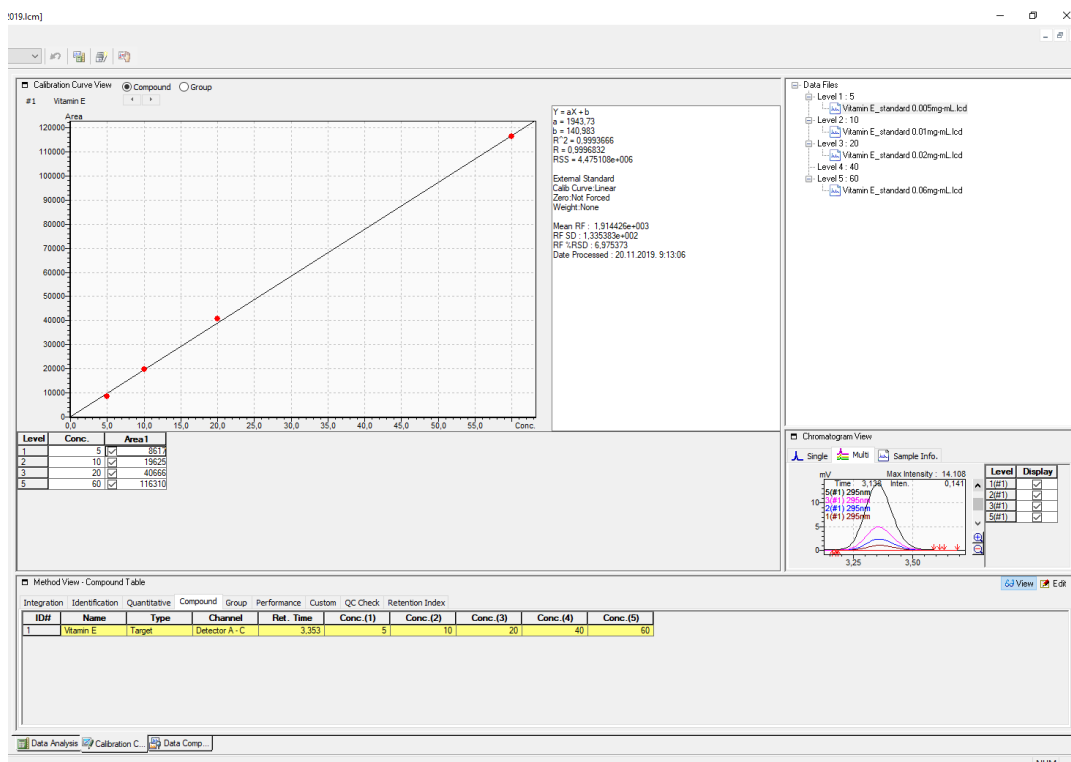
Nizu ranije pripremljenih standardnih otopina izmjerena je apsorpcija a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 1 i Slici 12. Upisivanjem izmjerenih vrijednosti u program kojim se upravlja korištenim HPLC, Lab Solutions, konstruiran je kalibracijski pravac (Slika 13 i 14). Koeficijent determinacije koji je izračunat iz dobivenog pravca iznosi  $R^2 = 0,9994$  pa možemo zaključiti da se izmjerene vrijednosti i regresijski pravac dobro slažu.

Tablica 1. Rezultati mjerenja apsorpcije niza standardnih otopina vitamina E.

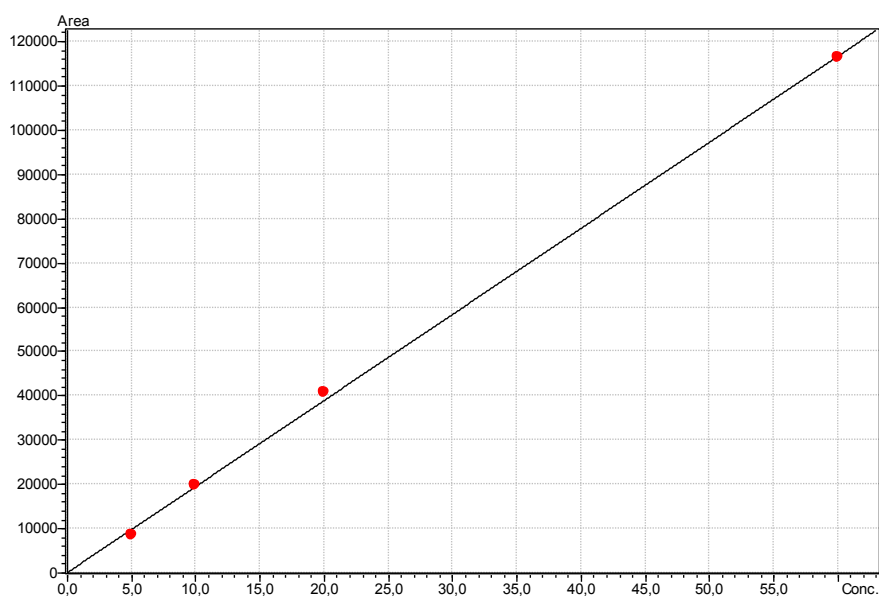
standard (mg/L)	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)
5	8617	1046	4,361
10	19625	2372	10,024
20	40666	4926	20,849
60	116310	14058	59,766



Slika 12: Usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem apsorpcije niza standardnih otopina vitamina E ( $\gamma =$  — 5 mg/L, — 10 mg/L, — 20 mg/L, — 60 mg/L).



Slika 13. Prikaz kalibracijske krivulje konstruirane pomoću upravljačkog programa Lab Solutions.



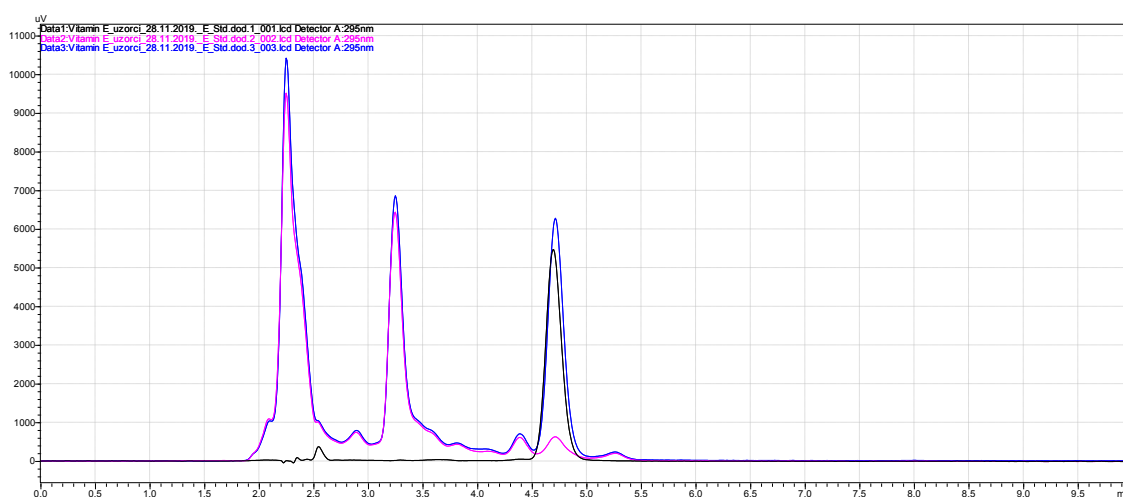
Slika 14. Kalibracijski pravac standardnih otopina vitamina E.

## 5.2. Provjera metode odabrane za određivanje sadržaja vitamina E

Provjera odabrane metode provedena je na ranije opisan način. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 2, a pripadajući kromatogrami prikazani su na Slici 15. Iz vrijednosti prikazanih u Tablici možemo zaključiti da se dobivene vrijednosti dobro slažu sa očekivanim pa metodu možemo smatrati prikladnom za određivanje sadržaja vitamina E u uzorcima jaja.

Tablica 2. Vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbancije uzoraka za provjeru metode.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)
1	55678	5437	28,572
2	5925	510	2,976
3	66063	6232	33,915
<b>Teoretski</b>	<b>61603</b>	<b>5947</b>	<b>31,548</b>
<b>% iskorištenja</b>	<b>107,2</b>	<b>104,8</b>	<b>107,5</b>



Slika 15. Prikaz kromatograma dobivenih provjerom metode

(— uzorak 1, — uzorak 2, — uzorak 3).



### 5.3. Određivanje koncentracije vitamina E u jajima

Svi uzorci jaja pripremljeni su za analizu prema ranije opisanom postupku. Dobiveni rezultati uspoređeni su s vrijednostima dostupnima u literaturi a koje iznose 1,29 mg/100 g cijelog jaja odnosno 5,21 mg/100 g žumanjka [28].

Od ukupno analiziranih sedam skupina jaja, pet skupina ima deset uzoraka jaja dok dvije skupine (druga i šesta skupina) imaju manji broj zbog nedostupnosti uzoraka.

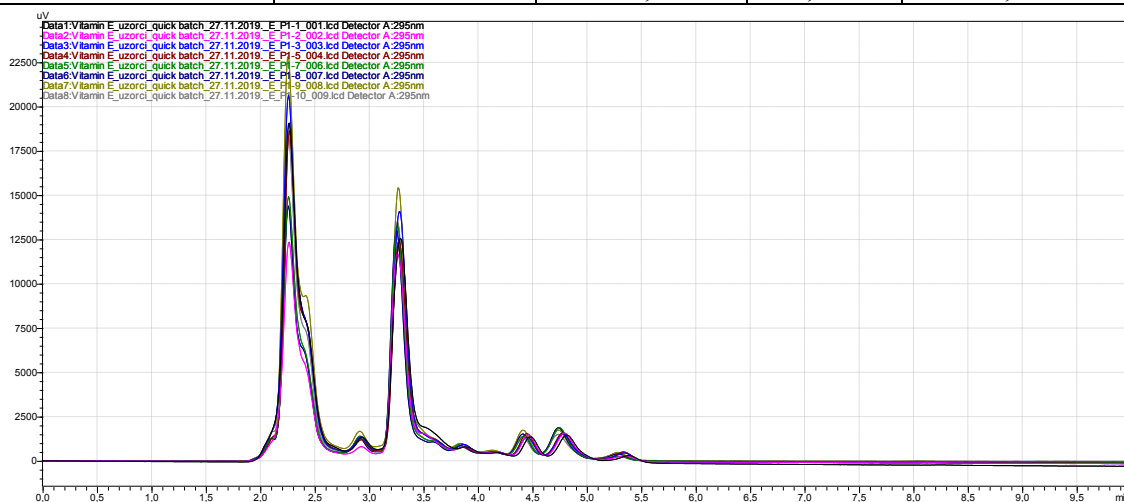
Rezultati svih analiziranih skupina uzoraka opisani su intervalom pouzdanosti, relativnom standardnom pogreškom ili relativnom standardnom devijacijom (RSD) i standardnom pogreškom ili standardnom devijacijom (SD). U obradu podataka nisu uvrštene vrijednosti koje značajnije odstupaju od prosječne vrijednosti i ti uzorci su u tablicama označeni plavom bojom.

Rezultati HPLC analize za prvu skupinu uzoraka (kontrolnu skupinu) prikazani su u Tablici 3 i na Slici 16. Prosječna vrijednost vitamina E u prvoj skupini je 34 % manja u odnosu na literaturne podatke. Pretpostavka je da je manja količina vitamina E posljedica sastava hrane nesilica. RSD vrijednost koja iznosi 6,09 % je prihvatljive vrijednosti i najmanja je vrijednost uspoređujući sa RSD vrijednostima svih ostalih skupina.

Tablica 3. Rezultati analize prve skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	22522	1569	11,514	3,458
2	21806	1606	11,146	3,347
3	21242	1540	10,856	3,260
4	13891	1174	7,074	2,124
5	22229	1600	11,364	3,413
6	10672	856	5,418	1,627
7	24226	1875	12,391	3,721
8	24507	1864	12,536	3,765
9	22419	1718	11,461	3,442
10	20550	1467	10,5	3,153
<b>srednja vrijednost</b>	22437,63	1654,88	11,471	<b>3,445</b>
<b>SD</b>	1358,74	149,97	0,699	0,210

<b>RSD (%)</b>	6,06	9,06	6,094	6,094
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	941,54	103,92	0,484	0,145



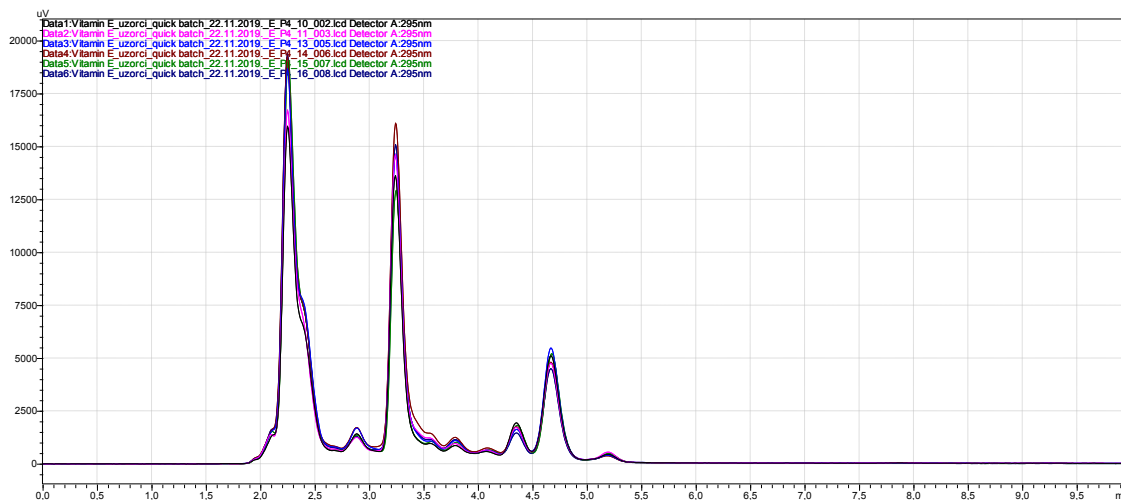
Slika 16. Kromatogrami prve skupine uzoraka jaja.

Druga i treća skupina su uzorci jaja koja su dobivena hranjenjem nesilica krmnom smjesom koja je obogaćena vitaminom E (druga skupina) i vitaminom E uz druge nutrice (treća skupina). Rezultati za drugu skupinu su prikazani u Tablici 4 i na Slici 17, a za treću skupinu u Tablici 5 i na Slici 18. Uspoređujući rezultate druge i treće skupine, vidimo da su veće srednje vrijednosti dobivene u drugoj skupini u kojoj su nesilice hranjene krmnom smjesom s dodatkom samo vitamina E. U odnosu na literaturne podatke vrijednosti druge skupine su 60 % a treće skupine 13 % veći. RSD vrijednost druge skupine je 6,7 % dok je za treću skupinu ta vrijednost nešto veća i iznosi 11 %.

Uspoređujući prosječne vrijednosti sadržaja vitamina E druge i treće skupine s prvom, kontrolnom skupinom u drugoj skupini je sadržaj vitamina E povećan za 142 % a u trećoj za 72 %.

Tablica 4. Rezultati analize druge skupine uzoraka jaja.

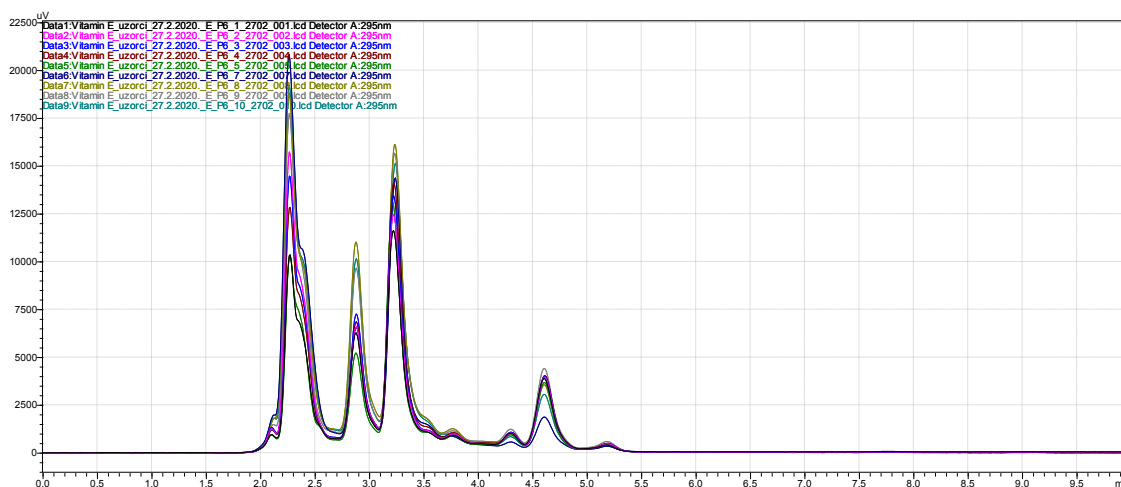
Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1.	206128	4113	23,747	7,131
2.	55915	5049	28,694	8,617
3.	52327	4704	26,849	8,063
4.	70599	6372	36,249	10,886
5.	59490	5411	30,536	9,170
6.	52773	4717	27,078	8,132
7.	55507	5153	28,485	8,554
8.	48942	4450	25,107	7,540
<b>srednja vrijednost</b>	54159,00	4914,00	27,792	<b>8,346</b>
<b>SD</b>	3628,07	352,30	1,867	0,561
<b>RSD (%)</b>	6,70	7,17	6,719	6,719
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	2903,01	281,89	1,494	0,449



Slika 17. Kromatogrami druge skupine uzoraka jaja.

Tablica 5. Rezultati analize treće skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1.	42175	3452	21,625	6,494
2.	33509	2678	17,167	5,155
3.	39609	3262	20,305	6,098
4.	385959	3182	19,784	5,941
5.	33079	2659	16,946	5,089
6.	25747	2601	13,174	3,956
7.	41713	3485	21,388	6,423
8.	34277	2758	17,562	5,274
9.	45192	3786	23,178	6,960
10.	37954	2977	19,454	5,842
<b>srednja vrijednost</b>	77051,89	3137,67	19,712	<b>5,920</b>
<b>SD</b>	115916,89	398,05	2,170	0,652
<b>RSD (%)</b>	150,44	12,69	11,006	11,006
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	75730,97	260,06	1,417	0,426



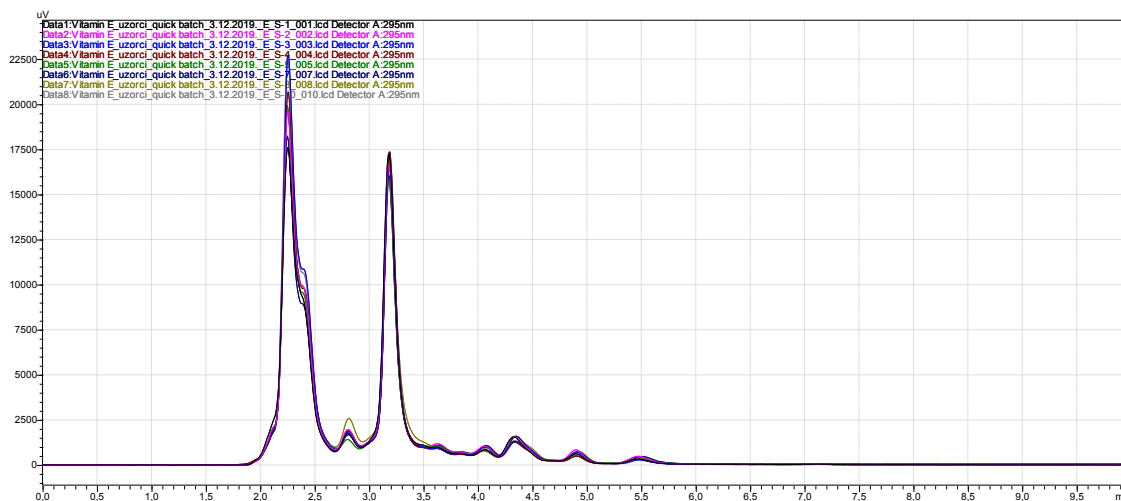
Slika 18. Kromatogrami treće skupine uzoraka jaja.

Rezultati analize za uzorke jaja dva proizvođača dostupna na hrvatskom tržištu u jednom trgovačkom lancu prikazani su u Tablici 6 i Slici 19 za prvog proizvođača (skupina četiri) i Tablici 7 i Slici 20 za drugog proizvođača (skupina pet). U jajima oba proizvođača koncentracija vitamina E je značajno manja u odnosu na literaturne podatke, a uspoređujući s kontrolnom skupinom manja je za 44 % u jajima prvog proizvođača

odnosno 18 % u jajima drugog proizvođača. Vrijednost RSD za četvrtu skupinu (prvi proizvođač) iznosi 9,7 % dok je za petu skupinu (drugi proizvođač) znatno veća i iznosi 25 % što je ujedno i najveća vrijednost RSD za sve skupine analiziranih jaja.

Tablica 6. Rezultati analize četvrte skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	13844	1185	7,050	2,117
2	13462	1143	6,853	2,058
3	12144	935	6,175	1,854
4	11165	904	5,672	1,703
5	11354	948	5,769	1,732
6	24787	1488	12,680	3,808
7	13720	1172	6,986	2,098
8	14361	1141	7,316	2,197
9	25716	1526	13,158	3,951
10	12007	956	6,105	1,833
<b>srednja vrijednost</b>	12757,13	1048,00	6,491	<b>1,949</b>
<b>SD</b>	1231,72	121,77	0,634	0,190
<b>RSD (%)</b>	9,66	11,62	9,761	9,761
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	853,52	84,38	0,439	0,132



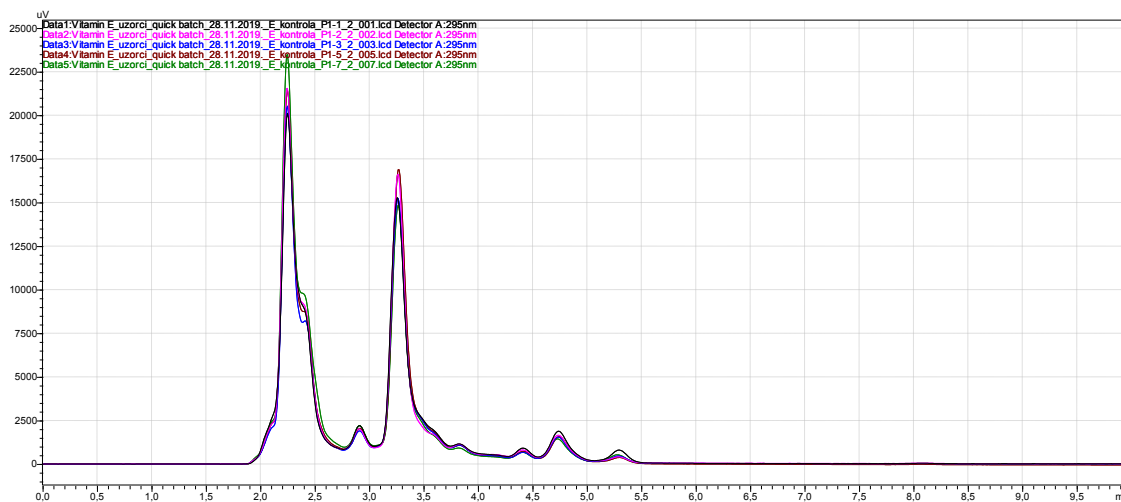
Slika 19. Kromatogrami četvrte skupine uzoraka jaja.

U tablici koja prikazuje rezultate uzoraka pete skupine možemo vidjeti da se svi rezultati mogu podijeliti u dvije skupine, u prvoj skupini srednja vrijednost je 2,810 mg/100 g žumanjka (RSD = 25,5 %) dok je u drugoj skupini uzoraka (uzorci označeni plavom bojom) srednja vrijednost 1,650 mg/100 g žumanjka (RSD = 32,9 %). Za svih

deset uzoraka pete skupine, srednja vrijednost koncentracije vitamina E iznosi 2,230 mg/100 g žumanjka uz RSD vrijednost 34,8 %. Pretpostavka je da je posljedica ovakvih velikih razlika u koncentraciji vitamina E sastav krmne smjese kojom su nesilice hranjene.

Tablica 7. Rezultati analize pete skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	25437	1829	13,014	3,908
2	15717	1363	8,014	2,407
3	20620	1508	10,536	3,164
4	11126	974	5,652	1,697
5	15370	1325	7,835	2,353
6	11187	953	5,683	1,707
7	14489	1203	7,382	2,217
8	11030	923	5,602	1,682
9	10767	922	5,467	1,642
10	10001	823	5,073	1,523
<b>srednja vrijednost</b>	18326,60	1445,60	9,356	<b>2,810</b>
<b>SD</b>	4639,40	240,37	2,387	0,717
<b>RSD (%)</b>	25,32	16,63	25,509	25,509
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	4066,54	210,69	2,092	0,628

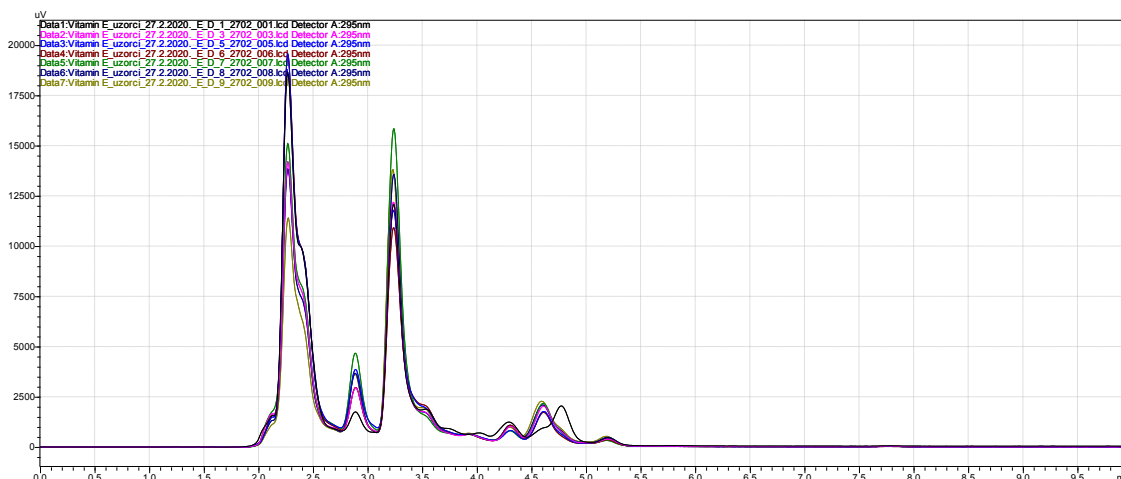


Slika 20. Kromatogrami pete skupine uzoraka jaja.

U Tablici 8 i na Slici 21 prikazani su rezultati analize jaja dobivenih s prvog OPG (šesta skupina), a u Tablici 9 i na Slici 22 prikazani su rezultati analize jaja dobivenih s drugog OPG (sedma skupina).

Tablica 8. Rezultati analize šeste skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	31346	1979	16,054	4,821
2	39076	2933	20,031	6,015
3	29996	2000	15,36	4,613
4	41969	2710	21,52	6,462
5	25076	1740	12,829	3,853
6	23798	1691	11,862	3,562
7	31627	2135	16,199	4,865
8	32805	2064	16,805	5,047
9	36550	2246	18,731	5,625
<b>srednja vrijednost</b>	30171,14	1979,29	15,406	<b>4,626</b>
<b>SD</b>	4429,73	201,39	2,355	0,707
<b>RSD (%)</b>	14,68	10,18	15,284	15,284
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	3281,53	149,19	1,744	0,524



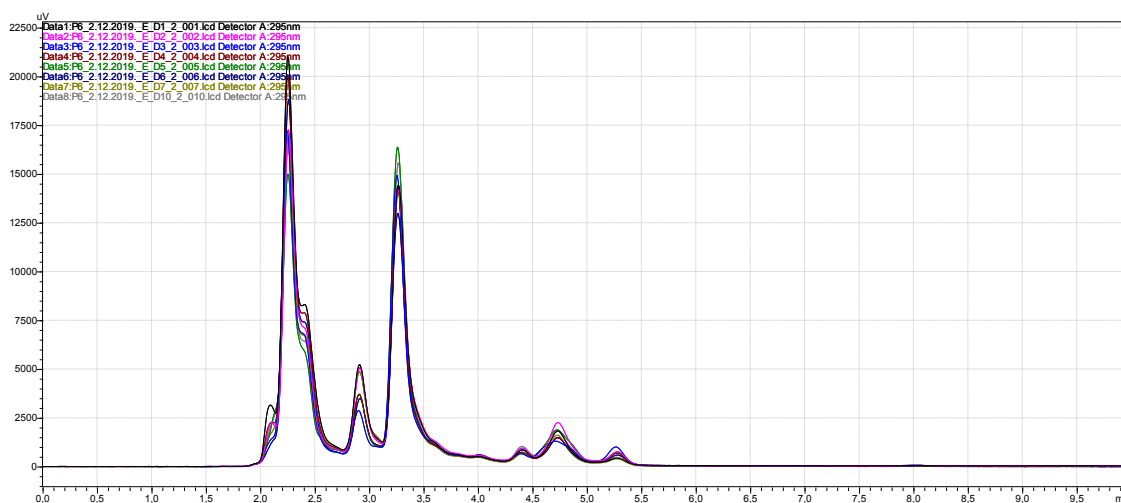
Slika 21. Kromatogrami šeste skupine uzoraka jaja.

Iz rezultata prikazanih u Tablicama 8 i 9 te Slikama 21 i 22, vidljivo je da se koncentracije vitamina E u jajima sa dva OPG razlikuju za samo 0,46 mg/100g žumanjka. Uspoređujući rezultate s literaturnim podacima, u šestoj skupini koncentracija vitamina E je 11 % a u sedmoj skupini 20 % manja. Ako rezultate uspoređujemo s kontrolnom skupinom koncentracija vitamina E u šestoj i sedmoj skupini je za 34 % odnosno 21 %

veća. Uzrok ovakvoj razlici odnosno smanjenoj i povećanoj koncentraciji vitamina E ponovo možemo naći u sastavu hrane kojom su se nesilice hranile.

Tablica 9. Rezultati analize sedme skupine uzoraka jaja.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	26049	1857	13,329	4,003
2	33622	2201	17,225	5,173
3	21085	1088	10,775	3,236
4	23943	1425	12,246	3,677
5	34152	1845	17,498	5,255
6	22813	1458	11,664	3,503
7	24516	1574	12,54	3,766
8	17844	966	9,108	2,735
9	15294	861	7,796	2,341
10	30676	1813	15,71	4,718
<b>srednja vrijednost</b>	27107,00	1657,63	13,873	<b>4,166</b>
<b>SD</b>	5033,62	342,20	2,590	0,778
<b>RSD (%)</b>	18,57	20,64	18,667	18,667
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	3488,06	237,13	1,795	0,539



Slika 22. Kromatogrami sedme skupine uzoraka jaja.

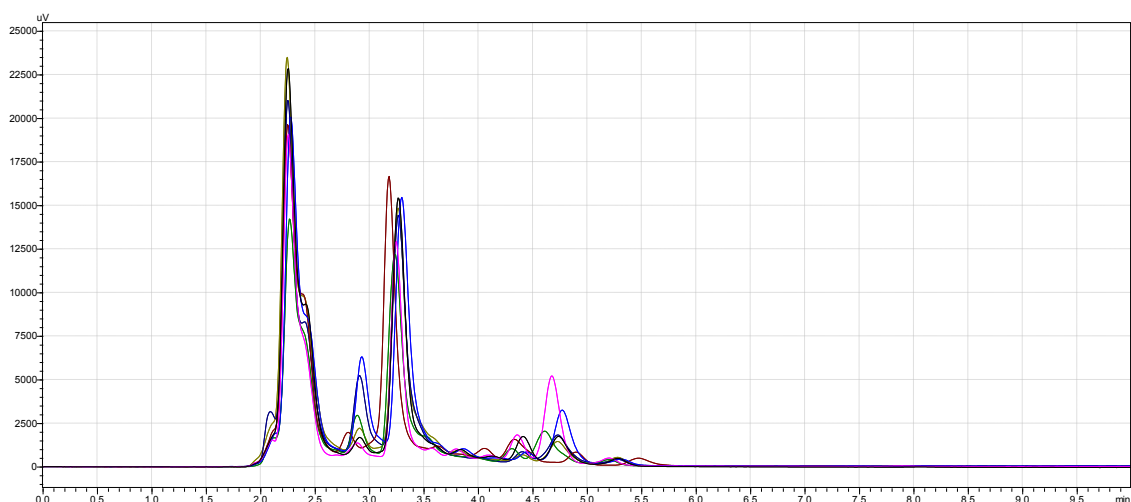
Iz rezultata prikazanih u Tablici 10 vidimo da je najveća koncentracija vitamina E određena u drugoj skupini (jajima dobivenim od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom standardnog sastava uz dodatak vitamina E). Najmanja koncentracija vitamina E



zabilježena je u jajima četvrte skupine (jaja jednog od dva proizvođača koja se dostupna u jednom trgovačkom lancu). Kao što je ranije navedeno, ovako velike razlike u koncentraciji vitamina E vjerojatno su posljedica sastava krmne smjese kojom su nesilice hranjene. Razlika u koncentraciji vitamin E u skupinama 2 i 3 gdje je u krmnu smjesu dodana jednaka količina vitamina E s tim da su u krmnu smjesu treće skupine uz vitamin E dodani i drugi nutricini treba se dodatno ispitati.

Tablica 10. Usporedba dobivenih koncentracija vitamina E u svim skupinama.

Skupina	mg/L (ppm)
1	3,445
2	8,346
3	5,920
4	1,949
5	2,810
6	4,626
7	4,166



Slika 23. Usporedba kromatograma dobivenih analizom uzoraka jaja

(prva skupina —, druga skupina —, treća skupina —, četvrta skupina —, peta skupina —, šesta skupina —, sedma skupina —).

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu analiziran je utjecaj dodataka funkcionalnih sastojaka krmnoj smjesi kojom su hranjene nesilice na udio vitamina E u žumanjku jajeta. Vitamin E je određivan u 7 skupina: kontrolna skupina su jaja dobivena od nesilica hranjenih standardnom krmnom smjesom, 2 skupine čija su jaja dobivena od nesilica hranjenih smjesom s dodatkom vitamina E te krmnom smjesom s dodatkom vitamina E i drugih nutracina, 2 skupine s jajima dobivenim od nesilica hranjenih krmnom smjesom nepoznatog sastava te 2 skupine čija su jaja dobivena od nesilica s dva obiteljska gospodarstva hranjena raznolikom hranom. Uzorci žumanjaka analizirani su pomoću tekućinske kromatografije visoke razlučivosti.

Najniža vrijednost vitamina E određena je u četvrtoj skupini, komercijalno dostupnim jajima u jednom trgovačkom lancu, a iznosi 1,949 mg/L. Nešto viša koncentracija zabilježena je u kontrolnoj skupini jaja nesilica koje su hranjene standardnom krmnom smjesom, a koncentracija iznosi 3,445 mg/L. Koncentracije u jajima dobivenim od nesilica s obiteljskog gospodarstva, hranjenim raznolikom hranom, iznosile su 4,626 mg/L te 4,166 mg/L. Najviša koncentracija vitamina E bila je u skupini gdje su jaja bila obogaćena vitaminom E, od čega je koncentracija vitamina u jajima dobivenim od nesilica hranjenih smjesom s dodatkom vitamina E iznosila 8,346 mg/L, a koncentracija u jajima nesilica hranjenih krmnom smjesom s dodatkom vitamina E i drugih nutracina iznosila 5,920 mg/L.

Analizom i usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da uzrok ovakvoj razlici odnosno smanjenoj i povećanoj koncentraciji vitamina E možemo naći u sastavu hrane kojom su se nesilice hranile. Povećani sadržaj vitamina E u jajima nesilica je posljedica vitaminom E obogaćene hrane za nesilice.

## 7. LITERATURA

1. Colombo M. L. *Molecules* 15(4) (2010)., 2103 – 2113.
2. Martino G., Haouet M. N., Marchetti S., Grotta L., Ponzielli V. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 2(4) (2014).
3. Grčević M., Gajčević – Kralik Z., Kralik G., Ivanković S. *Krmiva: časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, 53(2) (2011), 93 – 100.
4. Eitenmiller R. R., Lee J. *Vitamin E: food chemistry, composition and analysis*. CRC Press, 2004.
5. <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/vitamin-e/metabolizam/> 05. svibnja 2020.
6. <https://www.plantagea.hr/aromaterapija/tokoferoli-i-tokotrienoli/> 05. svibnja 2020.
7. Pellaud, S., Mène-Saffrané, L. *Frontiers in Plant Science*, 8 (2017), 1959.
8. <https://repozitorij.ktfsplit.hr/islandora/object/ktfst%3A447/datastream/PDF/view> 04. lipnja 2020.
9. Wu J. H., Croft K. D. *Molecular aspects of medicine*, 28(5 – 6) (2007), 437 – 452.
10. Brigelius – Flohe R., Kelly F. J., Salonen J. T., Neuzil J., Zingg J. M., Azzi A. *The American journal of clinical nutrition*, 76(4) (2002), 703 – 716.
11. <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/poblize-o-vitaminu-e-8021/> 04. Lipnja 2020.
12. <https://purnava.com/product/vitamin-e-egg/> 05. lipnja 2020.
13. Schafer, D. M. *Journal of Animal Science*, 74(2) (1996), 2406-2410.
14. Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. *Analytical biochemistry*, 269(2) (1999), 337-341.
15. Emmerie, A., Engel, C. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 57(12) (1938), 1351-1355.
16. Rupérez, F. J., Barbas, C., Castro, M., Martínez, S., Herrera, E. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2) (1998), 483-487.
17. Hewavitharana, A. K., Lanari, M. C., Becu, C. *Journal of Chromatography A*, 1025(2) (2004), 313-317.
18. Sahin, K., Sahin, N., Onderci, M. (2002). *Research in Veterinary Science*, 73(3) (2002), 307-312.
19. Lodge, J. K., Traber, M. G., Elsner, A., Brigelius-Flohé, R. *Journal of lipid research*, 41(1) (2000), 148-154.

20. Quaife, M. L. J. Biol. Chem., 169 (1947), 513-514.
21. Nair, P. P., Magar, N. G. Journal of Biological Chemistry, 220 (1956), 157-159.
22. Amin, A. S. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 51(3) (2001), 267-272.
23. Skřivan, M., Marounek, M., Dlouhá, G., Ševčíková, S. British Poultry Science, 49(4) (2008), 482-486.
24. Nollet L. M., Toldra F., eds. CRC Press (2012).
25. <https://www.htds.fr/en/analytical-sciences/chromatography/liquid-chromatography-hplc/> 05. lipnja 2020.
26. Džambić D. Završni rad (2019). Fakultet elektrotehnike, računarstva i informacijskih tehnologija u Osijeku.
27. Kralik Z., Kralik G., Grčević M., Kralik I., Ganter V. Brazilian Journal of Poultry Science, 20(1) (2018), 119 – 126.
28. Roe M., Pinchen H., Church S., Finglas P. Institute of Food Research, Department of Health (2013).

## 8. ŽIVOTOPIS

**Marija Elena Nikolić**

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Odjel za kemiju**

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

### **Osobni podatci:**

Adresa: Republike Hrvatske 34, 34340 Kutjevo

[marijaelenanikolic@gmail.com](mailto:marijaelenanikolic@gmail.com)

099/677-1757

Datum i mjesto rođenja: 12.03.1997., Požega

### **Obrazovanje:**

2018. – 2020. Sveučilišni diplomski studij na Odjelu za kemiju; istraživački smjer, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij na Odjelu za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

2011. – 2015. Gimnazija Požega, smjer: opća gimnazija

2003. – 2011. Osnovna škola Zdenka Turkovića Kutjevo

### **Ostale aktivnosti:**

Sudjelovanje na međunarodnim znanstvenim skupovima:

O. Galović, M. E. Nikolić, L. Dornjak, M. Marunica, Z. Kralik: *Sample preparation and analysis of nutrients content in table eggs*, Međunarodni znanstveno-stručni skup 18.

Ružičkine dani, Vukovar

Sudjelovanje na znanstvenoj konferenciji:

2019. Sudjelovanje na konferenciji „Dani mladih istraživača“

Sudjelovanje u aktivnostima na Sveučilištu J. J. Strossmayera uOsijeku:

2019./2018. Sudjelovanje na Smotri Sveučilišta J. J. Strossmayera