

Određivanje luteina u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Marunica, Matea

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:182:888675>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-09**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Matea Marunica

Određivanje luteina u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Diplomski rad

Osijek, 2020. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Matea Marunica

Određivanje luteina u jajima obogaćenim funkcionalnim sastojcima

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2020. godina

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

ODREĐIVANJE LUTEINA U JAJIMA OBOGAĆENIM FUNKCIONALNIM SASTOJcima

Matea Marunica

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

Mentor: doc. dr. sc. Olivera Galović

Sažetak:

Sadržaj luteina određivan je u ukupno šest skupina jaja. Četiri skupine nesilica hranjene su krmnim smjesama različitog sastava od kojih je u krmnu smjesu kojom su hranjene nesilice za jednu skupinu kao funkcionalni sastojak dodan samo lutein, dok je u krmnu smjesu za drugu skupinu nesilica, uz druge funkcionalne sastojke dodan i lutein. Dvije skupine jaja proizvedena su na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva. Lutein je određivan u žumanjku jaja korištenjem tekućinske kromatografije visoke razlučivosti s UV detekcijom. Najmanja koncentracija luteina određena je u kontrolnoj skupini i iznosila je 0,644 mg/100 g žumanjka dok je najveća koncentracija luteina 3,661 odnosno 3,789 mg/100 g žumanjka, određena u skupinama jaja koja su dobivena od nesilica koje su hranjene krmnim smjesama u koje je dodan lutein. Usporedbom s literaturnim podacima, u ove dvije skupine koncentracija luteina je povećana za oko šest puta. U jajima koja su proizvedena na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva, koncentracija luteina je povećana za šest odnosno četiri puta.

Diplomski rad obuhvaća: stranica: 45, slika: 30, tablica: 11, literaturnih navoda: 29

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: lutein, jaja, funkcionalni sastojci, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti

Rad prihvaćen: 1. rujna 2020.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, predsjednica
2. doc. dr. sc. Olivera Galović, mentor i član
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, član
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena 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 LUTEIN IN EGGS ENRICHED WITH FUNCTIONAL
INGREDIENTS**

Matea Marunica

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

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

Abstract:

Lutein content was determined in a total of six groups of eggs. Four groups of laying hens were fed with feed mixtures of different composition, lutein was the only added functional ingredient to the feed mixture for one group of laying hens, while lutein with other functional ingredients was added to the feed mixture for another group of laying hens. Two groups of eggs were produced on two family farms. Lutein was determined in egg yolks using high-performance liquid chromatography with UV detection. The lowest concentration of lutein was determined in the control group and was 0.644 mg / 100 g of yolk, while the highest concentration of lutein was 3.661 and 3.799 mg / 100 g of yolk, determined in groups of eggs obtained from laying hens fed with feed mixtures enriched with lutein. Compared with the literature data in these two groups, the lutein concentration was increased by about six times. In eggs produced on two family farms, the lutein concentration was increased by six and four times, respectively.

Thesis includes: *pages: 45, figures: 30, tables: 11, references: 29*

Original in: Croatian

Keywords: lutein, eggs, functional ingredients, high pressure liquid chromatography

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. Mirela Samardžić, Ph.D., associate prof., member
4. Martina Medvidović-Kosanović, Ph.D., assistant prof., alternate member

Thesis deposited in: Library of 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. Lutein	2
2.1.1. Karotenoidi.....	2
2.1.2. Biodostupnost i bioiskoristivost karotenoida	4
2.1.3. Kemijska i fizikalna svojstva luteina.....	8
2.1.4. Lutein u hrani	9
2.1.5. Lutein u ljudskoj probavi	11
2.1.6. Lutein i zdravlje ljudi	13
2.1.7. Dosadašnja istraživanja luteina	15
2.2. HPLC analiza s UV-VIS detekcijom	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Reagensi	20
3.2. Instrumentacija	20
3.3. Uzorci za analizu.....	23
3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti	23
3.4.1. Priprema standardnih otopina luteina.....	23
3.4.2. Priprema uzoraka jaja za analizu.....	25
3.4.3. Uvjeti analize i priprema HPLC za analizu.....	28
3.4.4. Kalibracija	28
3.4.5. Provjera valjanosti metode	29
3.5. Izračunavanje sadržaja luteina u jajima.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Izrada kalibracijskog pravca.....	31
4.2. Provjera valjanosti metode za određivanje koncentracije luteina pomoću HPLC	32
4.3. Određivanje koncentracije luteina u uzorcima jaja	33
5. ZAKLJUČAK	41
6. LITERATURA.....	42
7. ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

Lutein je organska molekula koja pripada skupini biljnih pigmenata karotenoida. Često se analizira zajedno sa svojim izomerom zeaksantinom koji pokazuje slična svojstva. Za normalno funkcioniranje ljudskog organizma potreban je dovoljan unos luteina kroz hranu budući da ga ljudski organizam ne može sintetizirati *de novo*. Lutein se može unijeti kroz razne vrste zelenog povrća i voća, te neke namirnice životinjskog podrijetla. Budući da je ova molekula hidrofobna, sama apsorpcija i transport kroz organizam se mora olakšati unosom u kombinaciji s lipidnim molekulama. Žumanjak jajeta predstavlja izvrsnu kombinaciju luteina i lipidnog matriksa pa se sve više istražuje mogućnost obogaćivanja ove namirnice luteinom i drugim funkcionalnim spojevima. Nedostatak luteina u organizmu se najčešće manifestira kroz poremećaje vida. Odličan je antioksidans i saveznik zdravih kognitivnih funkcija.

2. LITERATURNI DIO

2.1. Lutein

Lutein je prirodni biljni pigment i pripada skupini karotenoida. Nalazi se u brojnom voću, povrću i drugim namirnicama te je nužan za normalan rast i razvoj ljudskog organizma. Njegova fizikalna i kemijska svojstva slična su svojstvima drugih karotenoida, točnije skupini ksantofila. Kako bi se bolje razumjela svojstva luteina, potrebno je prvo upoznati opća svojstva karotenoida.

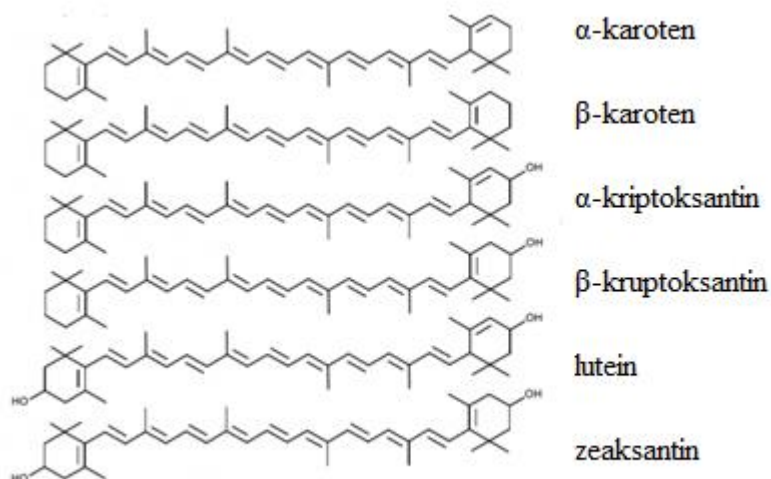
2.1.1. Karotenoidi

Karotenoidi su jedna od najčešćih skupina biljnih pigmenata pri čemu je do sada opisano više od 600 različitih molekula. Zaslužni su za žutu, narančastu te crvenu boju biljnih listova, cvjetova i stabljike kao i boju mnogih insekata, ptica i riba. Organizmi koji sami stvaraju ove molekule su biljke, alge, bakterije i gljive. Životinje nisu sposobne sintetizirati karotenoide *de novo*, moraju ih unositi hranom, ali ih mogu prevesti u druge, organizmu potrebnije oblike [1].

Neke vrste karotenoida se mogu prevesti u vitamin A, pa se takvi svrstavaju u skupinu takozvanih karotenoida provitamina A. Povećani unos karotenoida se povezuje sa smanjenjem rizika od raznih oftalmoloških i kardiovaskularnih bolesti i tumora. Imaju antioksidativnu ulogu čime štite organizam od oksidativnog stresa te oštećenja stanica i tkiva. Karotenoidi sudjeluju u staničnoj signalizaciji i utječu na redoks osjetljive regulacijske puteve.

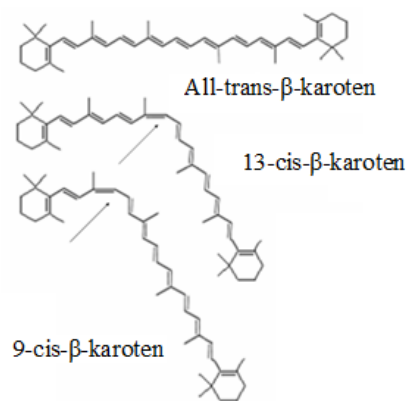
Karotenoidi imaju karakterističnu strukturu, oni su derivati ugljikovodičnog lanca koji se sastoji od 40 ugljikovih atoma te uglavnom na jednom ili oba kraja imaju cikličku strukturu. Dije se na ugljikovodične karotenoide bez kisikovog atoma i ksantofile, one koji posjeduju barem jedan kisikov atom. Kisikov atom je prisutan u obliku hidroksilne skupine kod luteina i zeaksantina što ih svrstava u skupinu ksantofila. Predstavnici prve skupine su α -karoten, β -karoten, γ -karoten, likopen i fitofluen te su ti spojevi zaslužni za žutu, crvenu i narančastu

boju mrkve, bundeve, rajčice, papaje, lubenice, naranče i drugih [2]. Ksantofili pretežno daju žutu i zelenu boju u namirnicama poput žumanjka, špinata, brokule, batata, manga i kukuruza. Uz lutein i zeaksantin, glavni predstavnici ove skupine su α -kriptoksantin i β -kriptoksantin (Slika 1).



Slika 1. Strukturni prikaz najčešćih karotenoida [3].

Biosinteza karotenoida u biljkama se odvija u plastidima poput kloroplasta ili kromoplasta. Sintaza se može odvijati preko dva puta, ovisna ili neovisna o mevalonskoj kiselini. Početna molekula sinteze je izopentenil-difosfat koja prolazi kroz nekoliko reakcija kondenzacije. Spajanjem dvije molekule geranilgeranil-difosfata nastaje izoprenski kostur karotenoida od 40 ugljikovih atoma povezanih konjugiranim dvostrukim vezama. Prvi nastali karotenoid je bezbojni fitoen iz kojeg enzimatskim reakcijama nastaju drugi karotenoidi [4]. Kostur se može modificirati ciklizacijom na jednom ili oba kraja, dodatkom funkcionalne skupine koja sadrži kisik te geometrijskom izomerizacijom [5]. Konjugirani sustav veza rezultira delokaliziranim π -elektronima koji uzrokuju karakteristična zajednička svojstva karotenoida poput apsorpcije svjetlosti, reakcije s radikalima te intenzivno obojenje ovih spojeva za čiju je pojavu potrebno bar 7 konjugiranih veza. Karotenoidi se u prirodnom okruženju najčešće nalaze u *all-trans* formi, no ovaj oblik molekule je izrazito nestabilan pa se uz svjetlost i toplinu pojedine veze lako prevode u *cis* oblik. β -karoten se tako najviše pojavljuje u *all-trans* obliku [6], nešto manje zastupljeni oblik je *15-cis*, a najmanje ima *13-cis* i *9-cis* oblika (Slika 2).



Slika 2. Prikaz struktura koje najčešće nastaju izomerizacijom β -karotena [6].

Obradom hrane, karotenoidi podliježu različitim geometrijskim izomerizacijama kao i degradaciji. Tako iz *all-trans*- β -karotena obradom najviše nastaje *13-cis*- β -karoten, pod utjecajem svjetlosti nastane *9-cis*- β -karoten, dok dugim skladištenjem nastaju *13-cis*- α i β -karoten [6]. Sterilizacijom i pasterizacijom sokova mrkve će nastati samo jedan izomer *13-cis*- β -karoten, dok će kuhanjem mrkve nastati *9-cis*- β -karoten. Smatra se da ova dva izomera nastaju uvijek u većinskom udjelu u neenzimatskom sustavu iz *all-trans* oblika. *All-trans*- β -karoten može nastati iz *cis* oblika pri visokoj temperaturi i prisutnosti zraka. Smatra se da je za ovaj proces potrebno prisustvo dušika, no sam mehanizam nije razjašnjen [6].

2.1.2. Biodostupnost i bioiskoristivost karotenoida

Osnovni izvor karotenoida u ljudskoj prehrani su različite vrste voća, povrća i mesa. Kloroplasti zelenih listova biljaka sadrže i do 45 % luteina, 25 % β -karotena te u manjim udjelima ostale karotenoide. Istraživanjem fotosustava I i II otkriveno je da je omjer molekula klorofila i karotenoida oko 3-4:1 [4, 6]. Tamniji listovi biljaka poput špinata imaju nešto veći sadržaj karotenoida od svjetlijih listova kao što je zelena salata. Istraživanjem crvenog, žutog i narančastog voća, prepoznato je nekoliko tipova biljnih namirnica obzirom na količinu i raspodjele karotenoida te se tako razlikuju namirnice bogate: likopenom, poput rajčice, β -karotenom i β -kriptoksantionom, kao što je papaja, β -karotenom, α -karotenom i luteinom, poput mrkve, epoksidima violaksantinom i neoksantinom što se uočava kod manga te posebna skupina bogata keto-karotenoidima, kao što su sapoteksantin i kriptokapsin u

crvenoj paprici. Većina namirnica sadrži karotenoide *trans* konfiguracije, rijetki su primjeri, poput žute rajčice, koja je izrazito bogata likopenom *cis* konfiguracije [4].

Namirnice životinjskog porijekla su bogate karotenoidima iako ih većina životinja ne može sintetizirati. Metabolizmom i akumulacijom karotenoida iz biljaka, meso životinja može poprimiti karakteristične boje karotenoida. Ovo je izrazito izraženo kod lososa, zlatnih riba, riba klauna te plamenaca. Ksantofili se zbog ove pojave akumulacije karotenoida dodaju u hranu nesilicama te se na taj način jaja mogu obogatiti luteinom, zeaksantinom, kapsantinom, kantaksantinom i drugim u slobodnom ili esterificiranom obliku. Kravlje mlijeko također može akumulirati značajne količine luteina, zeaksantina i β -karotena što najviše ovisi o prehrani i pasmini krava. Pasterizacija i obogaćivanje masnoćama doprinosi povećanju sadržaja karotenoida u mliječnim proizvodima. Kozje mlijeko je izrazito siromašno karotenoidima jer njegov matriks omogućava karotenima, koji su provitamin A, prelazak u oblik vitamina A [4]. Također, masno tkivo koze i ovce može akumulirati samo lutein, dok kravlje tkivo vrlo dobro akumulira lutein i β -karoten. Karakteristična boja mesa lososa uzrokovana je akumulacijom keto-karotenoida poput kantaksantina i astaksantina iz algi i zooplanktona. Divlji losos ima oko 10 puta veću količinu ovih karotenoida od kultiviranog lososa što je vidljivo i po intenzivnijoj boji mesa [4].

Raširenost karotenoida u brojnim namirnicama uzrokuje iznimno dobru biodostupnost, no samo okruženje karotenoida u namirnici i obrada iste smanjuje bioiskoristivost. Zbog izrazitog hidrofobnog karaktera, iskoristivost karotenoida iz namirnice je značajno manja za razliku od nekih hidrofilnih molekula, poput vitamina C. Prema dosadašnjim saznanjima, ljudski organizam može iskoristiti manje od 50 vrsta karotenoida što je vrlo malo obzirom na opisani broj ovih spojeva [4]. Da bi došlo do apsorpcije karotenoida u sluznici crijeva, namirnica se često mora termički obraditi kako bi se molekule oslobodile iz matriksa hrane koje će se kroz probavni sustav otapati i emulzificirati u obliku micela. Micele će omogućiti prolazak vrlo hidrofobnih molekula u hidrofilno okruženje ljudske probave.

Karoteni i ksantofili pokazuju različito ponašanje unutar ljudske probave. Karoteni imaju hidrofobnija svojstva od ksantofila koji imaju supstituirani prsten što im povećava polarnost i time topivost u vodi [1, 4]. U namirnicama životinjskog porijekla poput mlijeka, mliječnih proizvoda i jaja, karoteni se već nalaze u pogodnom matriksu za apsorpciju u organizam što povećava bioiskoristivost. Budući da su karoteni u ovim namirnicama posljedica akumulacije u tijelu životinja, količina karotena u njima nije dostatna za sve potrebe ljudskog

organizma. U voću i povrću se nalazi značajno veća količina karotena, no oni su „pakirani“ u veće i guste kristalične forme što ograničava pristup ljudskoj probavi. Termička obrada i prehrana bogata masnoćama povećava mogućnost otapanja ovih kristalića i time povećava bioiskoristivost namirnica. Uspoređujući β -karoten i lutein iz istih namirnica, lutein pokazuje do 5 puta bolju apsorpciju zahvaljujući svojoj malo hidrofилnijoj strukturi. Iznimku u karotenima pokazuju bezbojni fitoen i fitofluen [4]. Oni su uglavnom zastupljeni u *cis* formi što uzrokuje manju planarnost molekule i manju sklonost agregaciji u kristaliće. Ovi primjeri karotena su nešto manje rigidne molekule pa se kao takve lakše ugrađuju u micelle.

Bioiskoristivost ksantofila je značajno bolja od karotena zbog njihove polarnije strukture. Ove molekule posjeduju najmanje jedan kisikov atom u obliku hidroksilne, karbonilne, epoksilne ili metoksilne skupine što im omogućava lakše ugrađivanje u micelle. Osim što povećava polarnost molekule, hidroksilna skupina luteina i zeaksantina omogućava uspostavljanje vodikovih veza u vodenom mediju ljudske probave. Ksantofili poput violaksantina i neoksantina koji posjeduju epoksilnu skupinu nisu još otkriveni u ljudskoj krvi te se smatra da ih organizam nije sposoban apsorbirati [4]. Premda su u prirodi zastupljeni u *trans* obliku, obrada hrane često uzrokuje geometrijsku izomerizaciju. Takve molekule koje posjeduju bar jednu *cis* dvostruku vezu imaju manju tendenciju u stvaranju kristaličnih formi što povećava bioiskoristivost. U ljudskoj plazmi je zabilježena značajna količina all-*trans* luteina, β -kriptoksantina i β -karotena te 18 vrsta *cis* i *trans* oblika likopena. Iako kod drugih karotenoida pojava *cis* dvostruke veze povećava topljivost, β -karoten u tom obliku je i do 8 puta manje bioiskoristiv. Istraživanja su pokazala da β -karoten unešen u ovom obliku, ljudski organizam prevodi u all-*trans* oblik [4].

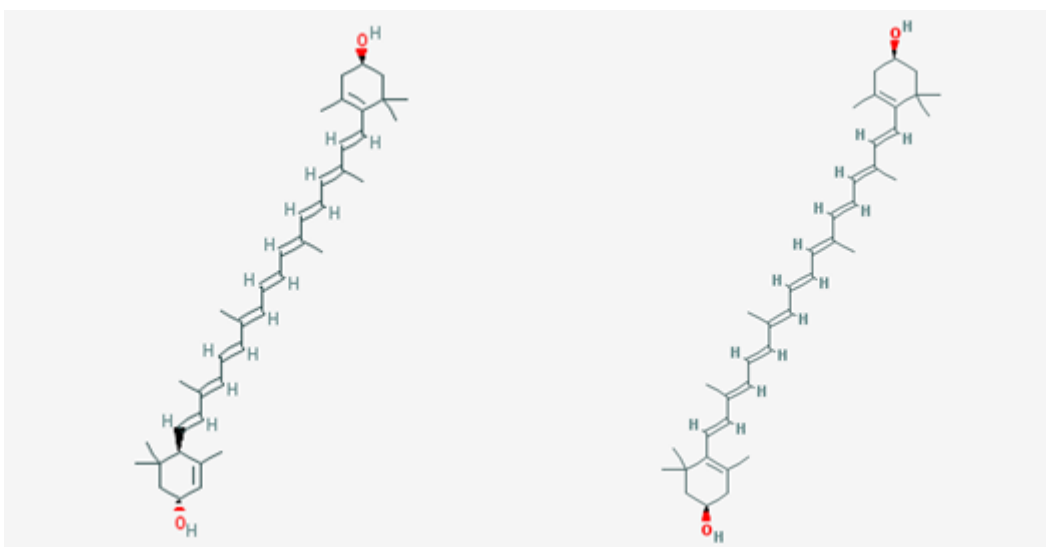
Hidroksilna skupina ksantofila ima mogućnost tvorenja estera s najčešće masnim kiselinama. Esterificirani ksantofili najviše su zastupljeni u laticama i plodovima biljaka, a najmanje u zelenim listovima [4]. Ova reakcija povećava lipofilnost molekule, iako se smanjuje polarnost i mogućnost stvaranja vodikovih veza. Esterifikacija povećava mogućnost akumulacije karotenoida u biljci u tekućoj kristaličnoj formi u kromoplastima. Ljudska probava hidrolizira estere do slobodnih ksantofila prije ulaska u sluznicu crijeva. Esterificirani oblik karotenoida je zabilježen u koži i majčinom mlijeku, dok to u krvnoj plazmi nije slučaj [4]. Enzim kojeg proizvodi gušterača, kolesterol esteraza ima katalitičku ulogu u hidrolizi estera karotenoida. Bioiskoristivost esterificiranih ksantofila najviše ovisi o stupnju hidrolize pomoću ovoga enzima [4].

Lišće zelenih biljaka akumulira karotenoide u kloroplastima unutar tilakoidne membrane te tvore stabilne proteinske komplekse. Karotenoidi u ovom slučaju imaju ulogu u fotosintezi te u stabilnosti i fluidnosti membrane. Zbog njihova vezanja za proteine membrane, teško su bioiskoristivi. Veća bioiskoristivost može se postići mehaničkom obradom hrane. Karotenoidi ne-zelenih biljaka, ostalog voća i povrća, se najčešće akumuliraju u kromoplastima. Kromoplasti mogu potjecati iz kloroplasta sazrijevanjem plodova te mogu biti globularnog i tubularnog oblika [4]. Globularni je zastupljen kod manga i naranči, a tubularni se zapaža kod rajčice i korijena mrkve te sadrži karotenoide u kristaličnom obliku što uzrokuje znatno manju bioiskoristivost od karotenoida iz globularnih kromoplasta. Hrana životinjskog porijekla pokazuje vrlo dobru bioiskoristivost. Količina i vrsta karotenoida ovisi o životinjskoj vrsti i njihovoj prehrani. Žumanjak, kao smjesa lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *Low-density lipoproteins*) i lipoproteina visoke gustoće (HDL, engl. *High-density lipoproteins*), predstavlja odlično lipidno okruženje za otapanje karotenoida poput luteina i zeaksantina koji se ovim putem vrlo lako apsorbiraju u organizam. Mlijeko i mliječni proizvodi bi se trebali konzumirati u punomasnom obliku jer to osigurava lipidno i proteinsko okruženje za dobru bioiskoristivost karotenoida [4].

Ovisno o matriksu u kojem se nalaze karotenoidi, obrada hrane može poboljšati ili smanjiti bioiskoristivost karotenoida. Mehaničkom obradom hrane; sjeckanjem, guljenjem, usitnjavanjem, karotenoidi se oslobađaju iz staničnih struktura te se ovim putem uvijek poboljšava bioiskoristivost. Termička obrada može pridonijeti bioiskoristivosti ukoliko su karotenoidi u kristaličnoj formi. Slobodni karotenodi izloženi toplini ili ultraljubičastom zračenju često podliježu degradaciji ili izomerizaciji te im je smanjena bioiskoristivost. Kuhanjem mrkve koja sadrži β -karoten u kromoplastima u kristaličnom obliku će se poboljšati bioiskoristivost ovog karotenoida. Termička obrada žumanjka jajeta koje obiluje luteinom i zeaksantinom može smanjiti bioiskoristivost do 22 % te uzrokovati izomerizaciju. Ukoliko se termički obradi, bioiskoristivost astaksantina iz mesa lososa se smanjuje i za 50 %. Međutim, istraživanjem termički obrađenog mesa divljeg lososa nije zabilježen primjetan pad bioiskoristivosti astaksantina [4].

2.1.3. Kemijska i fizikalna svojstva luteina

Lutein pripada skupini biljnih pigmenata karotenoida, točnije ksantofila. Posjeduje dvije hidroksilne skupine koje su smještene na supstituiranim prstenovima molekule. Geometrijska orijentacija hidroksilnih skupina i smještaj dvostruke veze u prstenu čine jedine strukturne razlike između luteina i njegovog izomera zeaksantina (Slika 3). Budući da su teško odvojivi, lutein i zeaksantin se često promatraju kao smjesa.



Slika 3. Prikaz strukture luteina i zeaksantina [7].

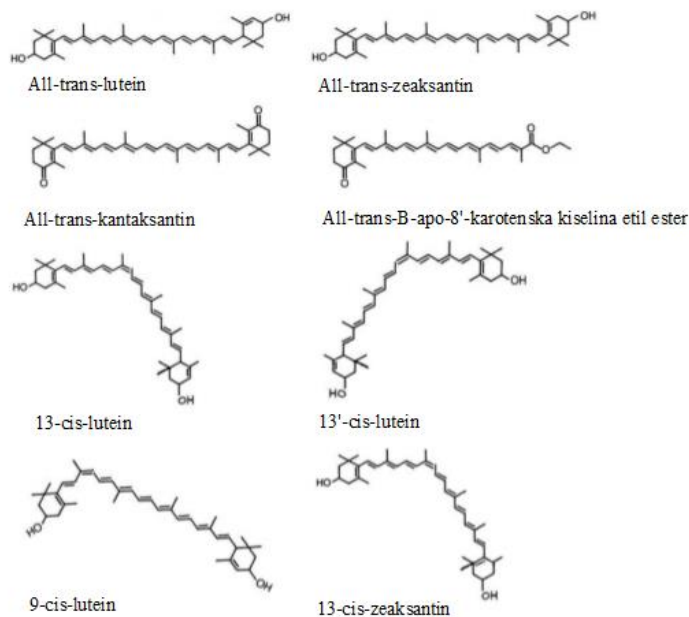
Molekulska masa luteina iznosi 568,886 g/mol, a molekulska formula mu je $C_{40}H_{56}O_2$. Kao i ostali karotenoidi, lutein je izrazito lipofilan, stoga je topiv u mastima, uljima i krvi, a netopiv u vodi. Čisti lutein je žućkasto-smeđa tekućina koja daje boju brojnom voću, povrću te namirnicama životinjskog porijekla. Lutein posjeduje niz od 10 konjugiranih dvostrukih veza pri čemu jedna pripada prstenu, a preostale ugljikovodičnom lancu. Konjugirani sustav dvostrukih veza omogućava apsorpciju svjetlosti i zračenja te uzrokuje žuto obojenje. Također, ovakva struktura čini lutein odličnim antioksidacijskim sredstvom jer vrlo lako reagira s reaktivnim kisikovim vrstama i drugim radikalima. Zbog posjedovanja dvije hidroksilne skupine, ove molekule su nešto polarnije od ostalih karotenoida. Djelomična polarnost im omogućava smještaj u proteinskom i lipidnom okruženju poput stanične membrane. Unutar micela koje im omogućavaju kretanje kroz organizam i apsorpciju, lutein se može nalaziti u samoj srži i bliže amfolitičkom sloju. U krvi se 50 % luteina prenosi

lipoproteinima visoke gustoće dok ostatak prenose lipoproteini niske i vrlo niske gustoće [8].

2.1.4. Lutein u hrani

Lutein ima bitnu ulogu u zdravlju ljudi, antioksidans je i neophodan za zdrav vid. Budući da se lutein, kao i ostali karotenoidi, ne može sintetizirati u ljudskom organizmu *de novo*, mora se unositi hranom. Izvor luteina može biti brojno voće, povrće te namirnice životinjskog porijekla. Sadržaj luteina i zeaksantina se značajno razlikuje među namirnicama [9]. Izraženo u molarnom udjelu obzirom na ukupnu količinu karotenoida, žumanjak jajeta sadrži 54 % luteina i 35 % zeaksantina. Kukuruz sadrži 60 % luteina i 25 % zeaksantina. Značajan sadržaj luteina je zabilježen kod kivija (54 %), crvenog grožđa (53 %), tikvica (52 %) i bundeve (50 %). Dok zelena paprika sadrži 36 % luteina i 3 % zeaksantina, narančasta paprika sadrži samo 8 % luteina i čak 37 % zeaksantina. Lutein kod crvene i žute paprike je znatno niži, a zeaksantin nije zabilježen. Udio zeaksantina u zelenom povrću poput špinata, celera, prokulica i zelene salate je neznatan (0-3 %), a udio luteina se kreće od 15 do 35 % [10].

Žumanjak jajeta se pokazao kao jedan od najboljih izvora luteina. Osim što je bogat luteinom i njegovim izomerom, matriks žumanjka omogućava organizmu odličnu bioiskoristivost luteina. Žumanjak sadrži oko 0.3-0.5 mg ksantofila od kojih je 0,14-0,16 mg lutein (Slika 4) [2]. Lipofilni matriks žumanjka sastavljen je od triacilglicerola, fosfolipida, proteina i kolesterola. Interakcijom proteina i lipida nastaju lipoproteini visoke i niske gustoće koji su glavni prijenosnici luteina. Karotenoidi čine oko 1 % mase žumanjka te definiraju boju. Veća koncentracija luteina uzrokuje narančasto-crveno obojenje, dok je zeaksantin zaslužan za žutu boju [11].



Slika 4. Prikaz struktura najzastupljenijih karotenoida u žumanjku jajeta [12].

Masovna proizvodnja i uvjeti uzgoja nesilica uzrokovali su značajan pad kvalitete jaja, tako i smanjenje koncentracije luteina u njemu. Pojavom sintetičkih karotenoida, boja jajeta više nije bila pokazatelj kvalitete. Povećanje svijesti potrošača o štetnosti sintetičkih aditiva i prednostima mikronutrijenata poput luteina, primoralo je proizvođače na drugačiji pristup proizvodnji jaja. Jaja se pokušavaju obogatiti funkcionalnim namirnicama poput luteina, vitamina E, seleni i drugih kako bi se njihova nutritivna vrijednost dodatno povećala (Slika 5).

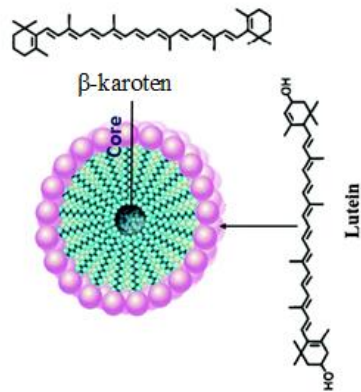


Slika 5. Komercijalna jaja obogaćena luteinom [13].

Pristup tome je pretpostavka da se obogaćivanjem krmne smjese nesilica direktno utječe na sastav jaja. U istraživanju koje su proveli Leeson i Caston nesilice su podjeljene u 3 skupine, prva je konzumirala smjesu kukuruza i sojinog ulja, druga skupina je hranjena kukuruznim glutenom i lucernom u kukuruznom ulju, a treća je hranjena lanenim uljem koje je bogato omega-3-masnim kiselinama [14]. Praćeni su veličina, oblik jajeta, boja i debljina ljuske te koncentracija luteina. Analiza je pokazala najbolji prijenos luteina u drugoj skupini. Prijenos luteina iz hrane nesilica se pokazao uspješnim, ali u malim razmjerima. Smatra se da je unos lipidnih komponenti poput lanenog, kukuruznog i sojinog ulja podjednako važan kao i unos luteina kako bi prijenos luteina iz hrane u žumanjak jajeta bio uspješan. Često se u krmnu hranu nesilica dodaje ulje šafranike te klorela koja je vrlo pogodna za obogaćivanje luteinom budući da se lako i brzo uzgaja te obiluje istim [15, 16].

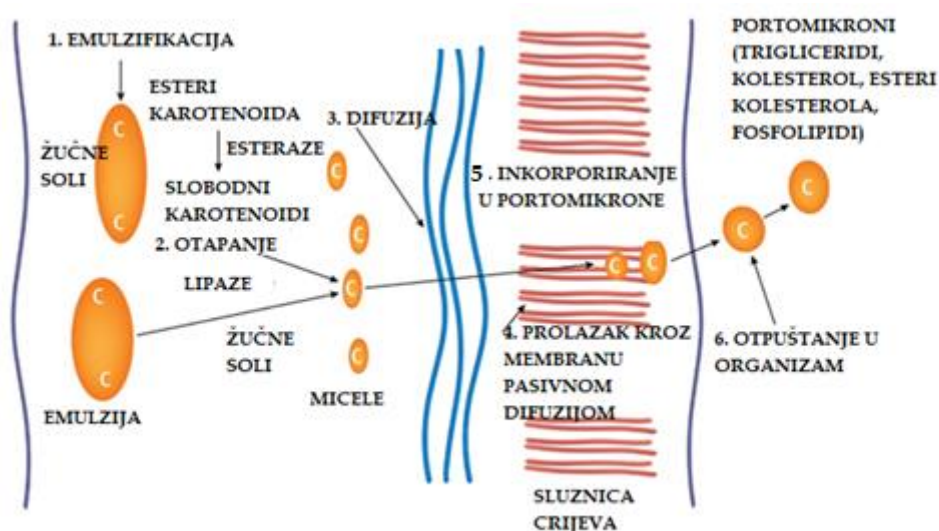
2.1.5. Lutein u ljudskoj probavi

Nakon što hrana bude mehanički ili termički obrađena, probava namirnice koja je izvor luteina započinje u ustima. Žvakanjem se dodatno mehanički obrađuje te enzim α -amilaza iz sline razgrađuje škrobne strukture ukoliko ih namirnica sadrži. Lipaze usne šupljine neznatno razgrađuju lipidne komponente. Mehanička obrada slijedi u želucu peristaltikom te enzimi lipaze i pepsini razgrađuju proteine i lipide te time osiguravaju nastajanje emulzije u kojoj će se formirati globularne lipidne nakupine pogodne za daljnji prijenos luteina. Žučne soli i lipaze u tankom crijevu razaraju nastale globularne nakupine u micide koje su ključne za apsorpciju luteina. Micide se sastoje od amfolitičkog i hidrofobnog dijela u kojem se nalazi lutein (Slika 6). Amfolitički sloj može biti sastavljen od kolesterola, masnih kiselina, fosfolipida, monoacilglicerola i žučnih soli [4].



Slika 6. Smještaj luteina i β -karotena u miceli [17].

Veličina micela može biti od 3 do 10 nm što ih čini pogodnim za prijenos luteina kroz sluznicu crijeva. Karoteni se najčešće zadržavaju u samoj srži micelle, dok su ksantofili smješteni bliže amfolitičkog sloja zbog blage polarnosti. Micele se ugrađuju u sluznicu dvanaesnika i ispuštaju karotenoide koji ulaze olakšanom difuzijom u Golgijev aparat gdje se ugrađuju u lipoproteine ultra niske i vrlo niske gustoće [4]. Ove strukture su znatno veće od micela, od 75 do 1200 nm, te mogu ući u limfni i krvožilni sustav čime se prenose do tkiva gdje su potrebni karotenoidi (Slika 7). Lutein i zeaksantin se prenose do oka gdje se akumuliraju unutar žute pjege.



Slika 7. Prikaz prolaska karotenoida kroz ljudsku probavu [18].

2.1.6. Lutein i zdravlje ljudi

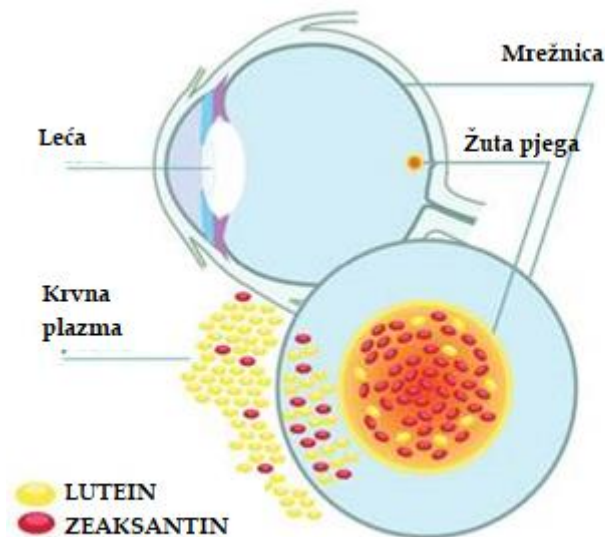
Ljudski organizam sastavljen je od brojnih molekula poput proteina, lipida i DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) koje su sklone interakciji s reaktivnim radikalima. Reakcija s radikalima može dovesti do raznih bolesti i mutacija stoga je organizam razvio načine borbe s oksidativnim stresom. Lutein kao molekula s nizom konjugiranih veza ima sposobnost suzbiti potencijalno štetno djelovanje radikala poput peroksilnog radikala i singletnog kisika [1, 5]. Reakcijom singletnog kisika s luteinom prenosi se energija, pri čemu singletni kisik prelazi u svoj osnovni oblik, molekularni kisik, a lutein u tripletno stanje prikazano reakcijom 1. Lutein otpušta dobivenu energiju u okolinu te se ponovno može koristiti kao antioksidativno sredstvo. Energetske razine između osnovnog i pobuđenog stanja luteina su vrlo blizu, također rezonancija omogućava delokalizaciju u pobuđenom stanju što čini lutein pogodnim antioksidansom koji neće svojom stabilizacijom narušiti stabilnost okolnih molekula.



Interakcija luteina s ostalim radikalima može biti nešto drugačija. Reakcijom sa slobodnim radikalima, može doći do dodatnih reakcija te proizvodnje energije u obliku topline. Potencijalne reakcije luteina s radikalom prikazane su u reakcijama 2 i 3 [5].



Fotooksidativni stres može uzrokovati oštećenja raznih tkiva poput kože i oka. Najčešća bolest koja se veže uz nedostatak luteina je staračka degenerativna promjena žute pjege, ARMD (engl. *Age-Related Macular Degeneration*). Ova bolest najviše pogađa stariju populaciju te može uzrokovati potpunu sljepoću uz neadekvatno liječenje. Žuta pjega je dio mrežnice oka i odgovorna je za stvaranje slike (Slika 8). Lutein i zeaksantin su glavne komponente žute pjege te su odgovorni za filtriranje plave svjetlosti i UV zračenja kako bi zaštitili oko od oštećenja [1].



Slika 8. Građa oka i smještaj luteina i zeaksantina [19].

Analizom žute pjege, nisu pronađeni drugi karotenoidi što dovodi do zaključka da je tkivo oka sposobno filtrirati lutein i zeaksantin iz smjese karotenoida unesenih hranom, no ovaj mehanizam nije razjašnjen. Uspoređivanjem ovih karotenoida s β -karotenom i likopenom ukomponiranih u liposomalnu membranu, zapaženo je da lutein i zeaksantin uspješnije filtriraju plavu svjetlost. Smatra se da je razlog tome mogućnost smještanja i orijentacije luteina i zeaksantina unutar liposomalne membrane [1]. Povećanjem koncentracije luteina u krvnoj plazmi, zapažena je povećana koncentracija luteina u žutoj pjegi. Pravilna prehrana bogata luteinom i zeaksantinom može spriječiti pojavu bolesti. Ukoliko se bolest pojavi i otkrije u ranijem stadiju, povećani unos ovih ksantofila može spriječiti daljnji napredak bolesti. Žumanjak jajeta predstavlja odličan izvor luteina i zeaksantina, no godinama se ograničavao unos zbog visoke koncentracije kolesterola. Istraživanja su pokazala da su jaja bogata HDL kolesterolom koji ne predstavlja opasnost za razvoj kardiovaskularnih bolesti poput ateroskleroze [1].

Osim utjecaja na vid, oksidativni stres može oštetiti neurone što može ometati međustaničnu signalizaciju ili uzrokovati apoptozu. Lutein štiti neurone od ovakvih pojava zbog čega se povezuje sa smanjivanjem rizika od poremećaja poput Alzheimerove bolesti, demencije i drugih. Budući da lutein može utjecati na apoptozu, djelovati kao antioksidans i protuupalni

agens, povezuje se sa sprječavanjem karcinogeneze. Pojačani unos luteina i zeaksantina se pokazao kao odličan saveznik u borbi protiv raka dojke, usne šupljine i debelog crijeva [12].

2.1.7. Dosadašnja istraživanja luteina

Lipofilno okruženje luteina i zeaksantina često otežava analizu iz organskih uzoraka poput jaja nesilica. Lutein se pojavljuje u slobodnom obliku i kao ester masnih kiselina što često otežava njegovu topljivost u klasičnim otapalima. Većina analiza luteina počinje ekstrakcijom organskim otapalom, jednokomponentnim ili višekomponentnim, nakon čega se otklanjaju zaostale lipidne komponente. Etil-acetat, metanol te aceton su jedna od najčešće korištenih otapala te se međusobno miješaju u različitim omjerima za izolaciju luteina. Mehanička obrada poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom poboljšava izolaciju luteina iz uzorka [12].

Analitičke metode koje se najviše koriste za analizu uzoraka luteina su spektrofotometrijska analiza, tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (HPLC, engl. *High-performance liquid chromatography*), tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskom masenom spektrometrijom (LC-MS/MS, engl. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) i tekućinska kromatografija ultravisoke razlučivosti (UHPLC, engl. *Ultra-high performance liquid chromatography*). Za rutinsku analizu luteina se najviše koristi HPLC analiza s kolonom obrnutih faza. LC-MS/MS je pogodna za diferencijaciju između luteina i zeaksantina što nije moguće u drugim metodama. UHPLC metoda je osjetljivija, preciznija i brža, no zbog relativno kratkog postojanja, još nije u širokoj uporabi u analizi luteina i zeaksantina [12].

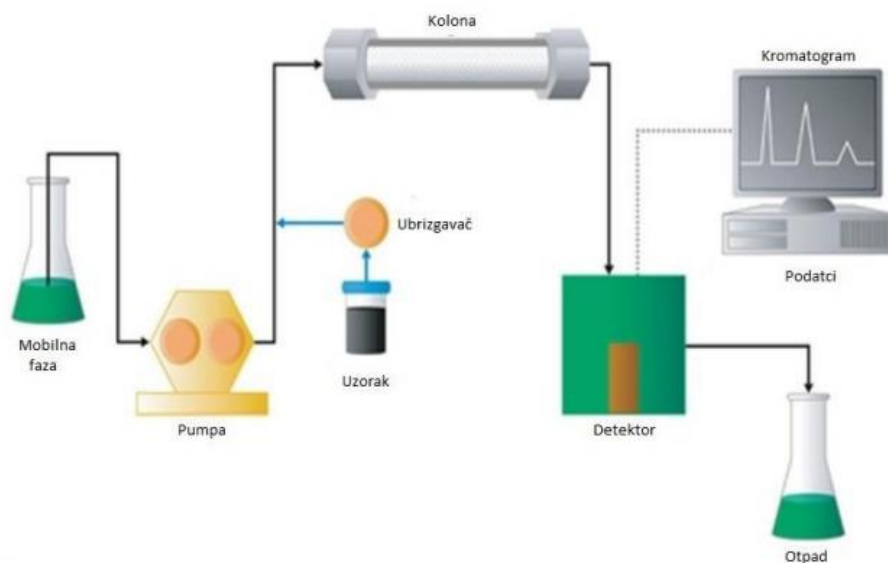
Castenmiller i suradnici su istraživali bioraspoloživost luteina u odnosu na β -karoten u cijelim listovima špinata, mljevenim, otopljenim te otopljenim uz dodatak probavnih vlakana. Ekstrahirali su karotenoide iz uzoraka špinata pomoću tetrahidrofurana te ponovno otopili u smjesi metanola i tetrahidrofurana (1:1 v/v). Tako pripremljen uzorak je analiziran HPLC metodom pri čemu je mobilna faza bila smjesa metanola i tetrahidrofurana (98:2 v/v). Dobivene vrijednosti bioraspoloživosti luteina su 45, 52, 55 te 54 %, dok su za β -karoten dobivene znatno niže vrijednosti od 5,1, 6,4, 9,5 i 9,3 %. Zamijećeno je znatno povećanje bioraspoloživosti β -karotena narušavanjem matriksa staničnih stijenki stanica špinata, dok

kod luteina nije zabilježen veći porast [20]. U istraživanju Holasova i suradnika, uzorci graška su nakon čišćenja i mehaničke obrade kuhani s 10 % kalijevim hidroksidom u etanolu. Saponifikacijom dobiven je slobodni lutein iz estera luteina i masnih kiselina. Kao antioksidans koristila se askorbinska kiselina. Ekstrakcija luteina iz uzorka se izvodila pomoću dietiletera koji je naknadno otparen. Talog luteina se otapao u heksanu te se analiza provodila HPLC metodom pri čemu je mobilna faza bila smjesa heksana i 2-propanola (95:5 v/v). Dobivene koncentracije luteina se znatno razlikuju među sortama graška. Žuti grašak sadrži u prosjeku 0,692 mg/100 g, dok su rezultati dobiveni za zeleni grašak nešto viši 0,978 mg/100 g [21]. Šivel i suradnici su određivali koncentraciju luteina u inkapsuliranim i praškastim uzorcima cvijeta nevena koji se koriste u proizvodnji dodataka prehrani. Uzorci su otopljeni u smjesi acetona i metanola (1:1 v/v) te su analizirani HPLC analizom. Analizom inkapsuliranih uzoraka ustanovljeno je da 9 od 16 uzoraka sadrži veći sadržaj luteina od one koju navodi proizvođač. Dva uzorka pokazala su znatno odstupanje u sadržaju luteina. Premda proizvođači navode koncentracije od 89 te 215 mg/g, u uzorcima su određene puno manje koncentracije od 2,02 te 23,8 mg/g. Analizom praškastih uzoraka ustanovljeno je da 9 od 18 uzoraka sadrži manje od 75% koncentracije luteina koju navodi proizvođač. U samo jednom uzorku je pronađena koncentracija viša od one navedene od proizvođača. Smatra se da su ovakvi rezultati posljedica veće stabilnosti inkapsuliranih od praškastih proizvoda [22]. Alison i Scott su pratili utjecaj smrzavanja i konzerviranja bijele i zlatne sorte kukuruza na koncentraciju luteina u odnosu na svježi kukuruz. Nakon homogenizacije, uzorci su otopljeni u metanolu i tetrahidrofuranu (1:1 v/v). Uzorcima je dodan kalijev hidroksid kako bi se esterificirani lutein preveo u slobodni uz askorbinsku kiselinu kao antioksidans. Nakon ekstrakcije s heksanom i etil acetatom (9:1 v/v), uzorci su podvrgnuti HPLC analizi. Svježi zlatni kukuruz je sadržavao u prosjeku 330 µg/100g, dok je bijeli sadržavao znatno manje, 5,5 µg/100g. Konzerviranje i smrzavanje nije značajno promijenilo koncentraciju luteina u obje sorte kukuruza, no značajno se povećao sadržaj ukupnih karotenoida što ukazuje na povećanje bioiskoristivosti zbog narušavanja staničnog matriksa stanica kukuruza [23]. U istraživanju Wenzela i suradnika, promatrala se optička gustoća žute pjege i koncentracija luteina u serumu tri ispitanika kroz 120 dana za vrijeme konzumacije 30 mg luteina i 2,7 mg zeaksantina po danu. Metodom fotometrije heterokromatskog treperenja, HCFP (engl. *Heterochromatic flicker photometry*) je utvrđeno linearno povećanje optičke gustoće žute pjege i nakon uzimanja suplemenata. HPLC analizom su se utvrđivale koncentracije luteina i zeaksantina. Rezultati su pokazali linearan rast koncentracije i 30 dana nakon uzimanja suplemenata. Ovakvi rezultati ukazuju na sposobnost organizma da skladišti lutein i

zeaksantin van žute pjege što se može naknadno koristiti u slučaju nedostatne konzumacije luteina i zeaksantina kroz prehranu [24]. Utjecaj dodataka prehrani kod roditelja na koncentraciju luteina u majčinom mlijeku i krvnoj plazmi dojenčadi promatrali su Sherry i suradnici. Pratila se koncentracija luteina kroz 6 tjedana u 3 skupine ispitanika. Prva placebo skupina roditelja uzimala je dodatke prehrani s 0 mg luteina, druga skupina 6 mg te treća skupina 12 mg dnevno. HPLC analizom utvrđeno je povećanje koncentracije luteina u majčinom mlijeku druge i treće skupine za 140 i 250 % u odnosu na placebo skupinu. Također povećala se koncentracija luteina u krvnoj plazmi roditelja za 170 i 250 %, a koncentracija u plazmi dojenčadi za 180 i 330 % čime se može zaključiti da se povećani unos luteina kroz prehranu majke pozitivno održava na koncentraciju luteina dojenčadi [25]. Harikumar i suradnici su proveli istraživanje o toksičnosti luteina u različitim dozama kroz 13 tjedana. Skupine štakora su bile hranjene dozama od 4, 40 i 400 mg po kilogramu tjelesne mase. Nakon 4 tjedna nije dokazan nikakav znak akutne toksičnosti kao ni znak subkronične toksičnosti po završetku istraživanja nakon 13 tjedana. Lutein ni u velikoj dozi nije utjecao na tjelesnu masu, težinu organa, apetit i smrtnost [26].

2.2. HPLC analiza s UV-VIS detekcijom

Kromatografska analiza podrazumijeva razdvajanje komponenata na temelju različite razdiobe između stacionarne i mobilne faze. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC, je često upotrebljavana metoda u kliničkim, kemijskim, biokemijskim i farmaceutskim analizama. Ono što HPLC metodu razlikuje od klasične tekućinske kromatografije je upotreba visokog tlaka pomoću pumpe što smanjuje vrijeme odvajanja komponenata analita. Klasičan HPLC uređaj sastoji se od pumpe koja uvodi mobilnu fazu, ubrizgivača koji unosi uzorak, kolone koja je ispunjena stacionarnom fazom te detektora koji bilježi podatke u obliku kromatograma (Slika 9). Postoje dvije vrste kromatografskih kolona, kolona normalnih faza i kolona obrnutih faza. Kolona normalnih faza ima polarnu stacionarnu fazu te nepolarnu mobilnu. Kolona obrnutih faza ima nepolarnu stacionarnu i polarnu mobilnu fazu. Vrsta kolone odabire se ovisno o svojstvima analita [27].

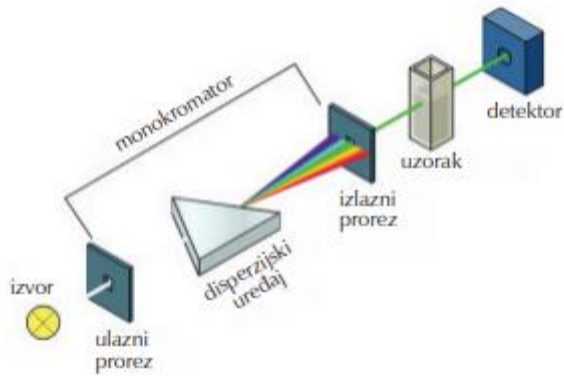


Slika 9. Dijelovi HPLC uređaja [27].

Analit mora imati sposobnost vezivanja za stacionarnu fazu, ovisno o jačini interakcije, analit će se određeno vrijeme zadržati na njoj te se naposljetku odvojiti i eluirati zajedno s mobilnom fazom do detektora. Razlučivost pika ukazuje na uspješnost razdiobe analita u koloni. Retencijsko vrijeme je vrijeme potrebno da analit od unosa u kolonu dođe do detektora. Konstanta razdiobe (K_C) karakteristična je konstanta za svaku tvar u određenom otapalu. Ova konstanta definirana je omjerom udjela tvari zadržane na stacionarnoj tvari (C_S) te udjela tvari koja se zadržava u mobilnoj fazi (C_M) što je opisano u jednadžbi 4.

$$K_C = C_S / C_M \quad (4)$$

Detektor HPLC se odabire ovisno o analitu. HPLC uređaj se može spregnuti s UV-VIS (engl. *Ultraviolet-visible*) detektorom, fluorescentnim detektorom, foto-diodnim detektorom, masenim spektrometrom, detektorom električne vodljivosti te detektorom indeksa loma [22]. UV-VIS detekcija koristi se zbog visoke preciznosti, jednostavnosti i točnosti. Kako bi se mogla primijeniti ova metoda, analit mora apsorbirati ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. UV-VIS detektor sastoji se od izvora zračenja (volframova ili deuterijeva žarulja), selektora valnih duljina koji se sastoji od sustava pukotina i disperznog sredstva, te kivete s uzorkom i detektora (Slika 10.) [28].



Slika 10. Dijelovi UV-VIS detektora [28].

Mjerenje ovom metodom temelji se na usporedbi intenziteta propuštenog (P) i upadnog zračenja (P_0) opisanog transmitancijom T (Jednadžba 5.).

$$T = P / P_0 \quad (5)$$

Koncentracija analita opisana je Lamber-Beerovim zakonom u jednadžbi 6. koja povezuje transmitanciju i apsorbanciju iz koje se može izračunati koncentracija.

$$A = -\log(T) = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (6)$$

Koncentracija uzorka c (mol/L) proporcionalna je apsorbanciji A te obrnuto proporcionalna duljini puta svjetlosti kroz kivetu L (cm) i molarnoj apsorptivnosti ε (L/mol cm). Ovaj zakon vrijedi samo kod razrijeđenih otopina i monokromatskog zračenja. Praktično, koncentracija uzorka se računa iz baždarnog dijagrama priređenog mjerenjem apsorbancije niza otopina poznatih koncentracija. Mjerenje se izvodi pri određenoj valnoj duljini pri čemu se pojavljuje apsorpcijski maksimum te je to karakteristično za svaku tvar [28].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Određivanje koncentracije luteina rađeno je po uzoru na metodu koju su razvili S. Leeson i L. Caston [14].

3.1. Reagensi

U radu su korišteni sljedeći reagensi:

- aceton, pro analysi (Gram-mol, Hrvatska),
- n-Heksan, HPLC grade (Carlo Erba, Francuska),
- etilacetat (Fisher Scientific, UK),
- metanol, HPLC grade (J. T. Baker, Poljska),
- tetrahidrofuran, HPLC grade (Fisher Scientific, UK).

3.2. Instrumentacija

U radu su korišteni instrumenti prikazani na slikama 11 do 14.



Slika 11. Tekućinski kromatograf visoke razlučivosti (Shimadzu).



Slika 12. Analitička vaga (KERN, Njemačka).



Slika 13. Magnetska miješalica s grijačem (IKA, Njemačka).



Slika 14. Laboratorijska treskalica za epruvete (IKA, Njemačka).

3.3. Uzorci za analizu

U 6 skupina uzoraka jaja određivana je koncentracija luteina. U svakoj skupini nalazilo se 10 jaja, osim u jednoj skupini jaja proizvedenih na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu gdje je za analizu korišteno 8 uzoraka jaja.

Kontrolna skupina – skupina jaja koja su dobivena od nesilica koje su hranjene standardnom krmnom smjesom.

Skupina 1 (komercijalno dostupna jaja) – jaja dostupna na hrvatskom tržištu, kupljena u trgovačkom centru.

Skupine 2 i 3 – skupine koje su dobivene od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom u koju je dodan samo lutein (skupina 2) odnosno uz lutein su dodani i drugi nutracijalni (skupina 3).

Skupine 4 i 5 - dvije skupine jaja proizvedenih na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva.

Sva jaja, nakon što su prikupljena, čuvana su u rashladnoj vitrini na temperaturi 4 °C.

3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti

3.4.1. Priprema standardnih otopina luteina

Pripremljena je otopina heksan:etil acetat = 65:35. Odvagano je 1,25 mg standarda luteina (Slika 15) i otopljeno u 25 mL prethodno pripremljene otopine heksan:etil acetat. Dobivena je osnovna otopina koncentracije 0,05 mg/mL (Tablica 1).

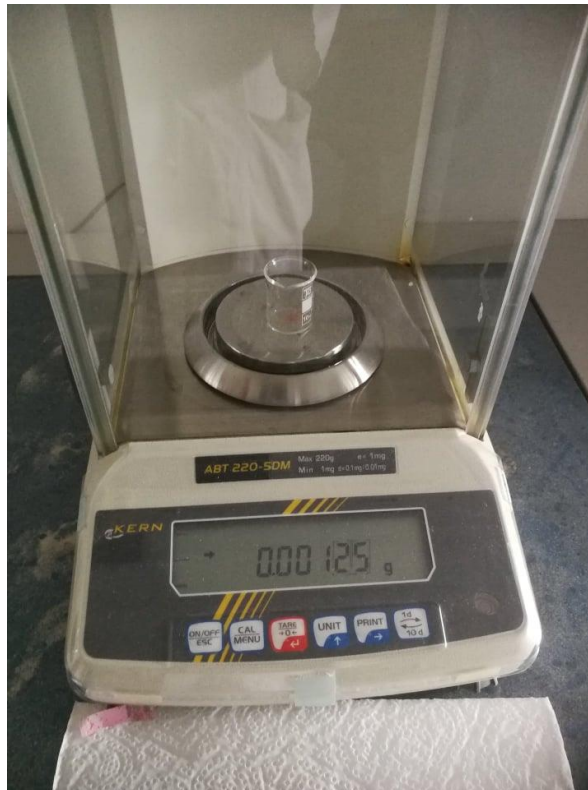
Tablica 1. Priprema osnovne otopine standarda luteina.

Lutein	
Formula	M
C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,871
osnovna otopina	
<i>m</i> (mg)	1,25
<i>V</i> (mL)	25
<i>m</i> (g)	0,00125
<i>V</i> (L)	0,025
<i>c</i> / mol/L	8,789·10⁻⁵
<i>V</i> _{tikvice} (mL)	5

Razrjeđivanjem osnovne otopine luteina dobivene su standardne otopine luteina za izradu kalibracijskog pravca. Volumeni osnovne otopine i dobivene koncentracije prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Priprema standardnih otopina luteina iz osnovne otopine.

standard	μL osn. otopine luteina	mL osn. otopine luteina	γ / mg/L
1	25	0,025	0,25
2	50	0,05	0,50
3	125	0,125	1,25
4	250	0,25	2,50
5	500	0,5	5,00



Slika 15. Vaganje standarda luteina.

3.4.2. Priprema uzoraka jaja za analizu

Žumanjak uzoraka jaja pažljivo je odvojen od bjelanjka te posušen pomoću papirnatog ručnika (Slika 16).



Slika 16. Žumanjci izdvojeni iz uzoraka jaja.

Izvagano je 0,500 g uzorka žumanja (Slika 17) te je dodano 5 mL acetona (Slika 18). Smjesa je 30 s miješana pomoću laboratorijske treskalice te je ostavljena u mraku 1 sat kako bi se sav lutein ekstrahirao u aceton.

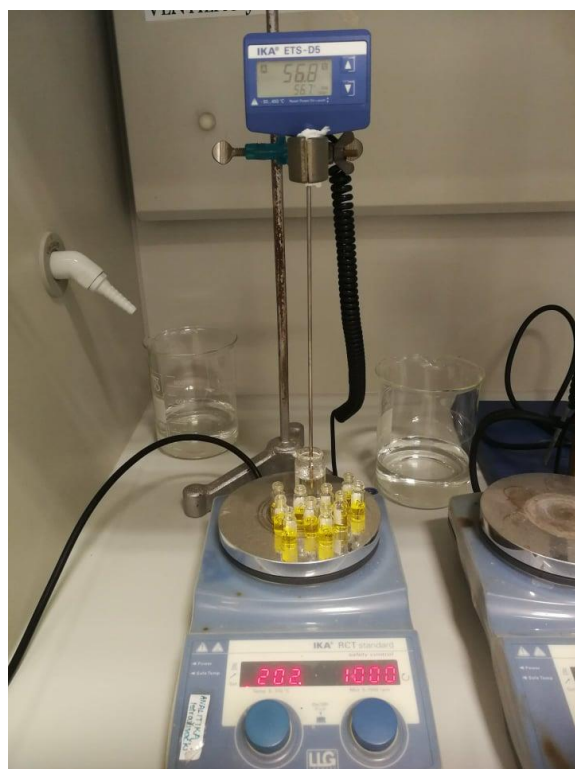


Slika 17. Vaganje uzoraka žumanjka.

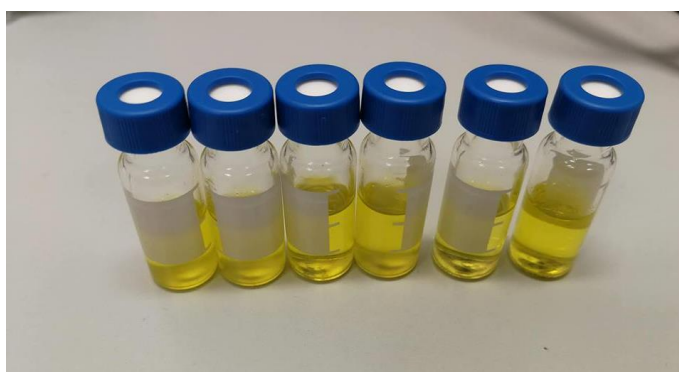


Slika 18. Izdvajanje luteina iz žumanjka dodatkom acetona.

Alikvot supernatanta (1 mL) je izdvojen u vialice te oprezno zagrijavan dok sav aceton nije otpario (Slika 19). Luteinu koji je zaostao na dnu vialica je dodan 1 mL otopine heksan:etil acetata = 65:35. Vialice su potom začepljene čepovima predviđenim za automatski prikupljiivač uzoraka (Slika 20) te je sadržaj dobro promiješan.



Slika 19. Zagrijavanje uzoraka na temperaturi vrelišta acetona.



Slika 20. Uzorci luteina otopljeni u n-heksanu i etil acetatu.

3.4.3. Uvjeti analize i priprema HPLC za analizu

HPLC je prije izvođenja analiza potrebno pripremiti. Priprema se sastoji od ispiranja sustava metanolom nakon čega se sustav ispire mobilnom fazom koja se koristi za analizu, sve dok bazna linija ne bude ravna a tlak stabilan.

Uvjeti analize:

- Protok: 1 mL/min,
- Temperatura pećnice: sobna temperatura,
- Vrijeme trajanja analize: 10 min,
- Valna duljina: 450 nm,
- Injektirani volumen: 20 μ L,
- Mobilna faza: metanol:tetrahidrofur = 9:1.

Pri mjerenju je korištena kolona Shim-pack GIST, 4,6x250 nm, 5 μ m, C18 (Shimadzu).

Vrijeme zadržavanja luteina je 4,08 minuta.

3.4.4. Kalibracija

Kako bi se smanjila sistemska pogreška prije mjerenja pomoću instrumenta, provodi se postupak umjeravanja (kalibracije). Tim postupkom uspostavlja se odnos između mjernog signala i mjerne veličine kako bi kao rezultat mjerenja dobili željenu informaciju.

Nakon što se razrjeđivanjem standardne otopine čija je koncentracija 1,25 mg/25 mL pripremi serija standardnih otopina kako je prikazano u Tablici 2., izmjeri se apsorbancija za svaki standard i iz dobivenih vrijednosti, pomoću programa Lab Solutions, konstruira se kalibracijski pravac.

3.4.5. Provjera valjanosti metode

Kako bi provjerili je li odabrana metoda prikladna za određivanje koncentracije analita u uzorku, provodi se provjera valjanosti metode. Provjera se provodi na način da se mjere apsorbancije standarda, realnog uzorka i smjese standarda i realnog uzorka. Zbroj pojedinačnih signala standarda i realnog uzorka treba biti jednak signalu smjese standarda i realnog uzorka.

Priprema uzoraka za provjeru valjanosti metode:

Uzorak 1: 500 μL otopine standarda 1,25 mg/L + 500 μL mobilne faze,

Uzorak 2: 500 μL otopine realnog uzorka + 500 μL mobilne faze,

Uzorak 3: 500 μL otopine standarda 1,25 mg/L + 500 μL otopine realnog uzorka.

3.5. Izračunavanje sadržaja luteina u jajima

Program koji se koristi za upravljanje korištenim HPLC sustavom (Lab Solutions) koncentraciju luteina u jajima izražava u ppm (engl. *parts per million*) vrijednostima odnosno mg/L. Kako bi dobivene vrijednosti mogli uspoređivati s vrijednostima dobivenima u drugim istraživanjima, potrebno je dobivene vrijednosti izraziti kao mg/100 g žumanjka.

Vrijednosti potrebne za izračun:

m (žumanjka) = 0,500 g

V (acetona koji se koristi za ekstrakciju) = 5 mL

V (injektiranog uzorka) = 20 μL

m (luteina, rezultat HPLC analize)

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

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

$$m(\text{luteina u } 20 \mu\text{L}) = \frac{m(\text{rezultat HPLC analize})[\mu\text{g}] \cdot 20 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}}$$

$$OMJER = \frac{m(\text{luteina u } 20 \mu\text{L})}{m(\text{žumanjka u } 20 \mu\text{L})} = m(\text{luteina})[\mu\text{g/g}]$$

$$m(\text{luteina})[\text{mg/g}] = \frac{m(\text{luteina})[\mu\text{g/g}]}{1000}$$

$$m(\text{luteina})[\text{mg}/100 \text{ g}] = (\text{luteina})[\text{mg/g}] \cdot 100$$

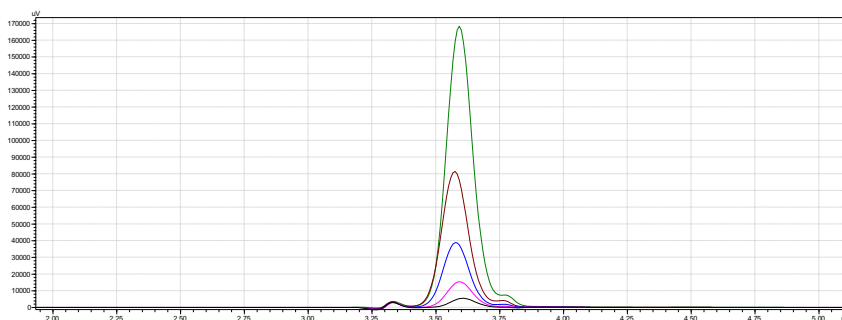
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izrada kalibracijskog pravca

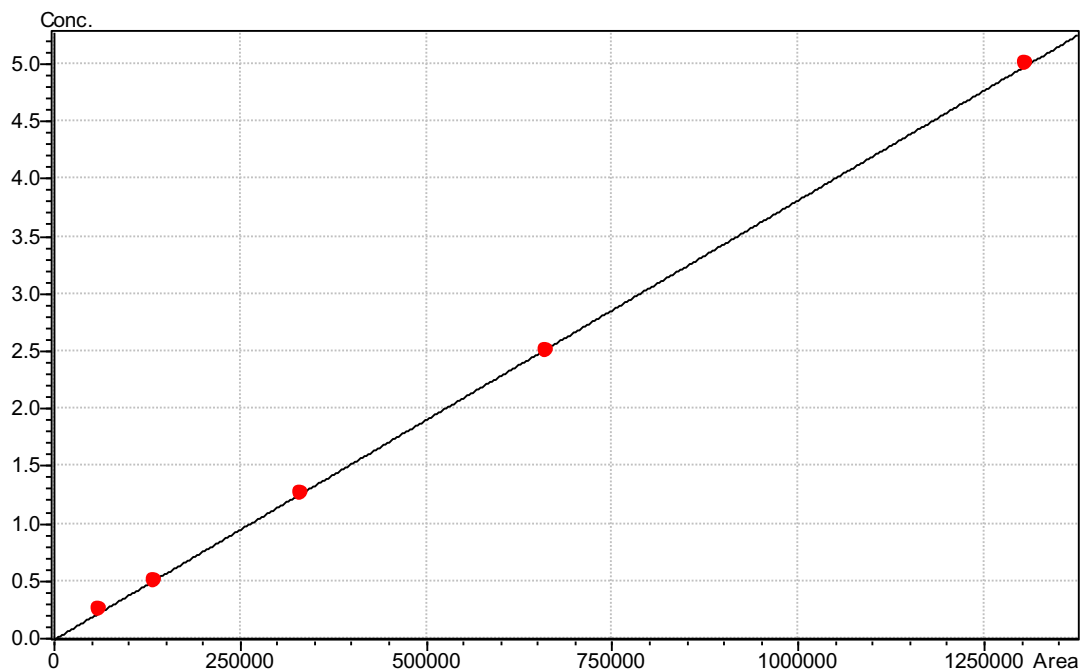
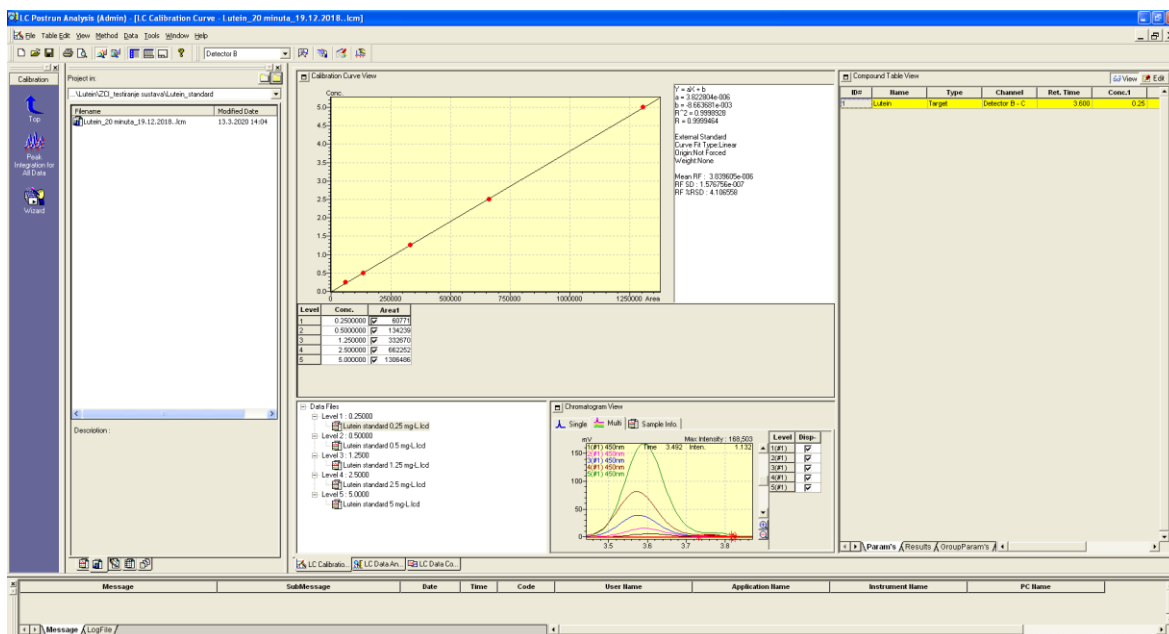
Izmjerene vrijednosti apsorbancije za seriju standardnih otopina luteina koje su pripremljene na ranije opisani način prikazane su u Tablici 3., a usporedba kromatograma dobivenih mjerenjem serije standardnih otopina prikazana je na Slici 21. Upravljački program Lab Solutions korišten je za izradu kalibracijskog pravca (Slika 22.) a dobiveni koeficijent determinacije $R^2 = 0,9999$ ukazuje na izvrsno slaganje izmjerenih vrijednosti s regresijskim pravcem što potvrđuje da je metoda odgovarajuća za određivanje koncentracije luteina u realnim uzorcima.

Tablica 3. Rezultati mjerenja serije standardnih otopina luteina.

standard (mg/L)	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)
0,25	60771	6422	0,224
0,5	134239	16236	0,505
1,25	332670	39668	1,263
2,5	662252	82071	2,523
5	1306486	16869	4,986



Slika 21. Usporedba kromatograma serije standardnih otopina luteina (— 0,25 mg/L, — 0,5 mg/L, — 1,25 mg/L, — 2,5 mg/L, — 5 mg/L).



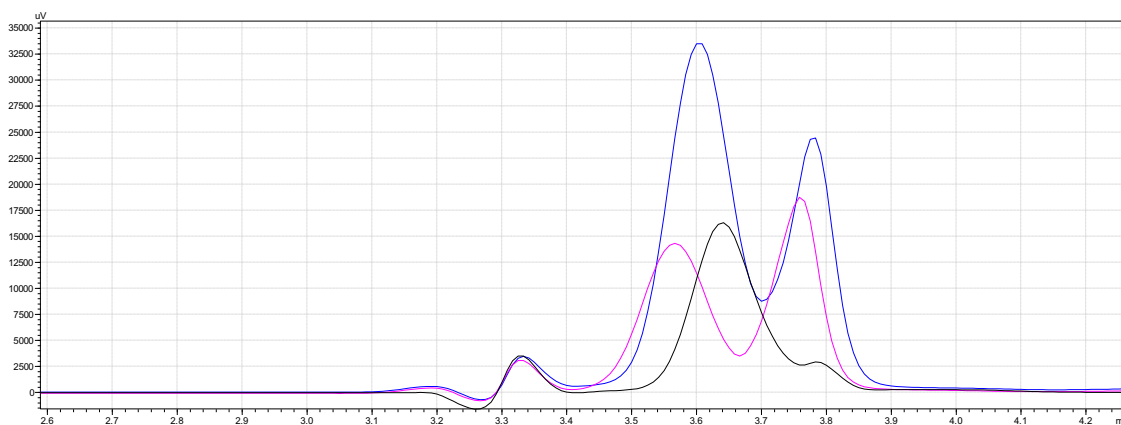
Slika 22. Prikaz kalibracijskog pravca dobivenog korištenjem programa Lab Solutions.

4.2. Provjera valjanosti metode za određivanje koncentracije luteina pomoću HPLC

Prema ranije opisanom postupku provedena je provjera valjanosti metode. Vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbanacije uzoraka prikazane su u Tablici 4. i na Slici 23.

Tablica 4. Vrijednosti dobivene mjerenjem aposrbancije uzoraka za provjeru valjanosti metode.

uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)
1	163148	17545	0,615
2	117697	14996	0,441
3	251924	34061	0,954
teoretski	280845	32541	1,06
% iskorištenja	89,70	104,67	90,34



Slika 23. Kromatogrami uzoraka korištenih za provjeru valjanosti metode
(Uzorak 1 —, Uzorak 2 —, Uzorak 3 —).

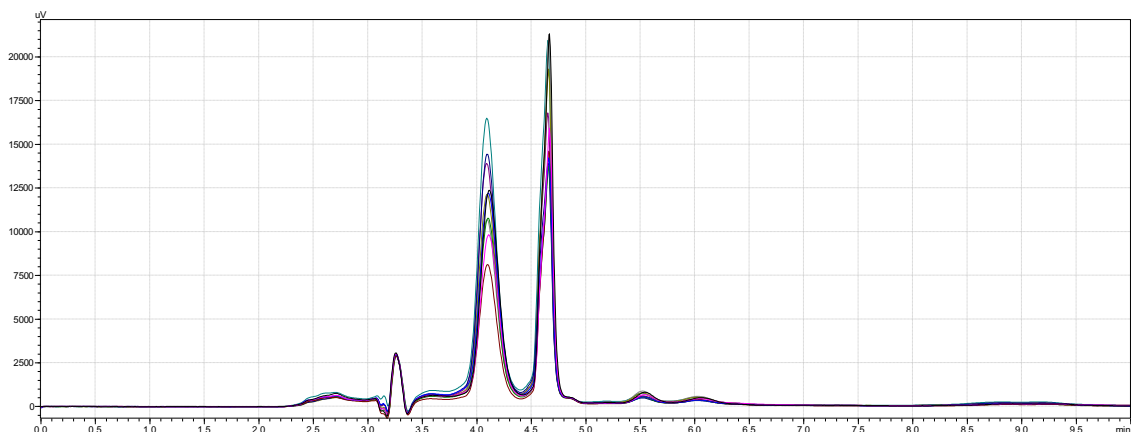
Dobro slaganje dobivenih vrijednosti potvrđuje da je metoda odgovarajuća za određivanje koncentracije luteina u realnim uzorcima. Zbog oscilacija u tlaku maksimumi za lutein se ne nalaze na istom vremenu zadržavanja.

4.3. Određivanje koncentracije luteina u uzorcima jaja

Uzorci jaja su za HPLC analizu pripremljeni prema ranije opisanom načinu. Prema literaturnim podacima, sadržaj luteina u sirovim jajima iznosi 0,094 mg/100 g cijelog sirovog jajeta odnosno 0,575 mg/100 g sirovog žumanjka [29].

Za svaku skupinu uzoraka, rezultati su opisani standardnom pogreškom (standardnom devijacijom, SD), relativnom standardnom pogreškom (relativnom standardnom devijacijom, RSD) i intervalom pouzdanosti.

Na Slici 24 i u Tablici 5 prikazani su rezultati analize za kontrolnu skupinu.



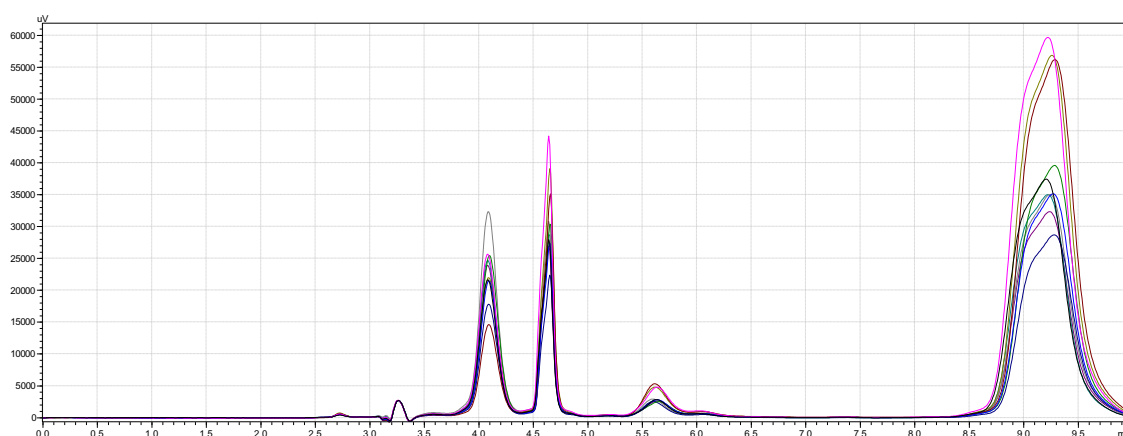
Slika 24. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima kontrolne skupine.

Tablica 5. Koncentracija luteina u uzorcima kontrolne skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	169731	12561	0,64019	0,64019
2	141254	9973	0,53132	0,53132
3	170129	12331	0,64171	0,64171
4	118524	8400	0,44443	0,44443
5	155275	11146	0,58492	0,58492
6	202784	14702	0,76654	0,76654
7	173751	12437	0,65555	0,65555
8	156197	10984	0,58845	0,58845
9	226454	16695	0,85703	0,85703
10	192858	14208	0,72859	0,72859
srednja vrijednost	170695,70	12343,70	0,644	0,644
SD	31050,34	2414,85	0,119	0,119
RSD (%)	18,19	19,56	18,435	18,435
interval pouzdanosti (±)	19244,85	1496,71	0,074	0,082

U kontrolnoj skupini izmjeren je prosječni sadržaj luteina 0,644 mg/100 g žumanjka. Ova vrijednost nešto je veća (12 %) od literaturnih podataka koji iznose 0,575 mg/100 g žumanjka, no koncentracija luteina u žumanjku jaja ovisi o sastavu krmne smjese kojom su

nesilice hranjene ali i o metabolizmu pojedine nesilice. Relativna standardna pogreška od 18,44 % govori u prilog prethodnim tvrdnjama. Usporedimo li rezultate kontrolne skupine s rezultatima dobivenima određivanjem koncentracije luteina u jajima koja su komercijalno dostupna (Slika 25, Tablica 6), gdje koncentracija luteina iznosi 1,179 mg/100 g žumanjka, vidljivo je povećanje od čak 105 % u odnosu na literaturne podatke, odnosno u odnosu na kontrolnu skupinu 83 %. Možemo pretpostaviti da je uzrok ovog povećanja sastav krmne smjese koju su nesilice konzumirale ali ne možemo to tvrditi jer na pakiranju nije naveden sastav krmne smjese. U skupini komercijalno dostupnih jaja, relativna standardna pogreška ima visoku vrijednost 15,55 %. U statističku obradu rezultata prve skupine uzoraka nije uzet u obzir rezultat uzorka 5 jer dosta odstupa od vrijednosti unutar skupine.

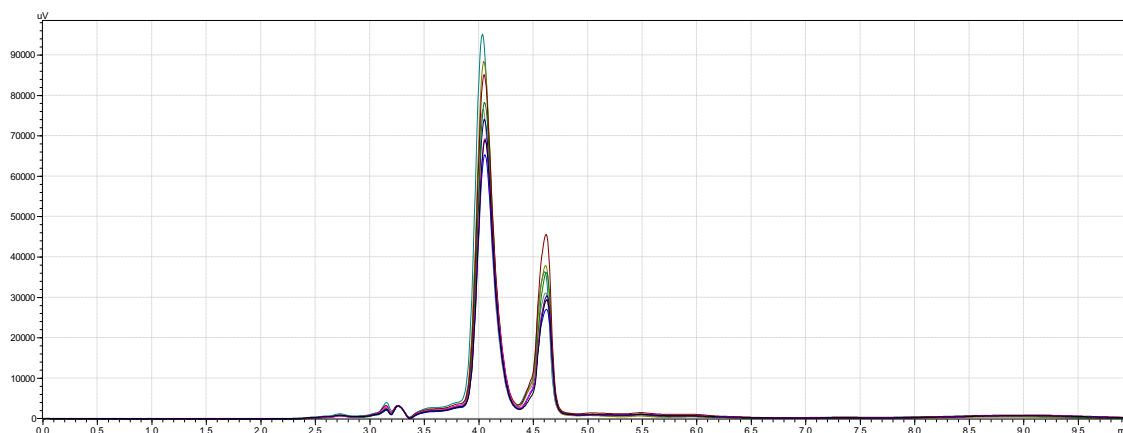


Slika 25. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima prve skupine.

Tablica 6. Koncentracija luteina u uzorcima prve skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	283599	22089	1.07548	1.07548
2	335375	26115	1.27341	1.27341
3	279036	21963	1.05804	1.05804
4	327551	25871	1.24350	1.24350
5	201308	15125	0.76090	0.76090
6	237742	18283	0.90018	0.90018
7	291266	22406	1.10479	1.10479
8	410380	32742	1.56014	1.56014
9	322475	25117	1.22410	1.22410
10	309326	24351	1.17383	1.17383
srednja vrijednost	310750.00	24326.33	1.179	1.179
SD	47967.51	3997.42	0.183	0.183
RSD (%)	15.44	16.43	15.549	15.549
interval pouzdanosti (±)	31338.20	2611.60	0.120	0.120

Druga skupina uzoraka su jaja dobivena od nesilica koje su konzumirale hranu obogaćenu luteinom. Na Slici 26 i u Tablici 7 prikazani su rezultati analize.



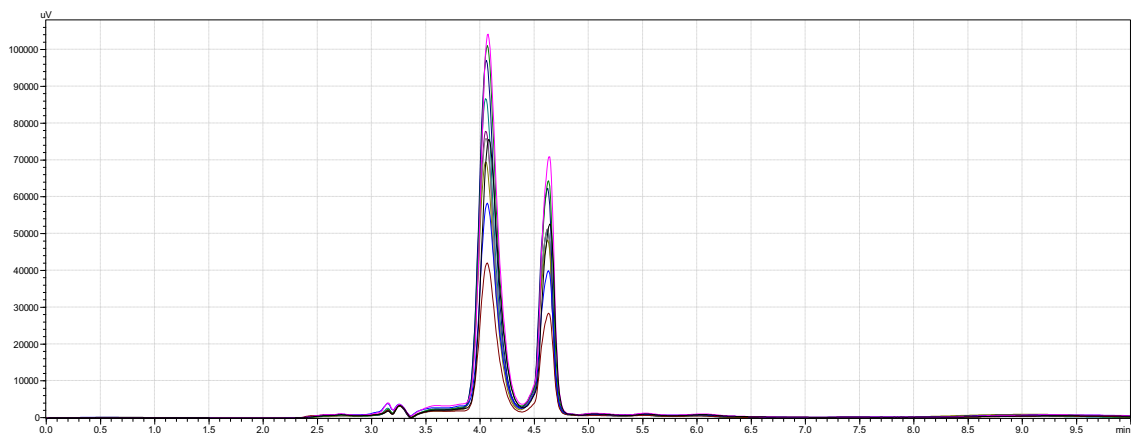
Slika 26. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima druge skupine.

Tablica 7. Koncentracija luteina u uzorcima druge skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	852104	68809	3.24876	3.24876
2	884080	69260	3.37100	3.37100
3	816508	65350	3.11269	3.11269
4	1060719	85104	4.04626	4.04626
5	965934	78336	3.68277	3.68277
6	904680	74168	3.44975	3.44975
7	607254	47532	2.31275	2.31275
8	1074128	88364	4.04100	4.04100
9	938726	76509	3.57990	3.57990
10	1157469	95033	4.41611	4.41611
srednja vrijednost	961594.22	77881.44	3.661	3.661
SD	113844.24	9910.73	0.429	0.429
RSD (%)	11.84	12.73	11.707	11.707
interval pouzdanosti (±)	74376.87	6474.89	0.280	0.280

Dobivena srednja vrijednost ukazuje na povećanje koncentracije luteina u žumanjku jaja 6,5 puta u odnosu na literaturne podatke. Srednja vrijednost dobivenih rezultata treće skupine (3,789 mg/100 g žumanjka) (Tablica 8, Slika 27) je vrlo slična rezultatima druge skupine, no kod treće skupine vrijednost relativne standardne pogreške je veća (17,42 %) što ukazuje na nešto veće rasipanje dobivenih vrijednosti unutar uzoraka treće skupine. U statistički izračun nije uzeta vrijednost uzorka 7 iz druge skupine i uzorka 4 iz treće skupine jer njihove

vrijednosti odstupaju od ostalih vrijednosti unutar skupine. Kako je treća skupina uzoraka dobivena od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom u koju je dodan lutein ali i dugi nutricini, možemo zaključiti da dodatak drugih nutricina, u ovom istraživanju, nema utjecaja na povećanje koncentracije luteina u jajima.



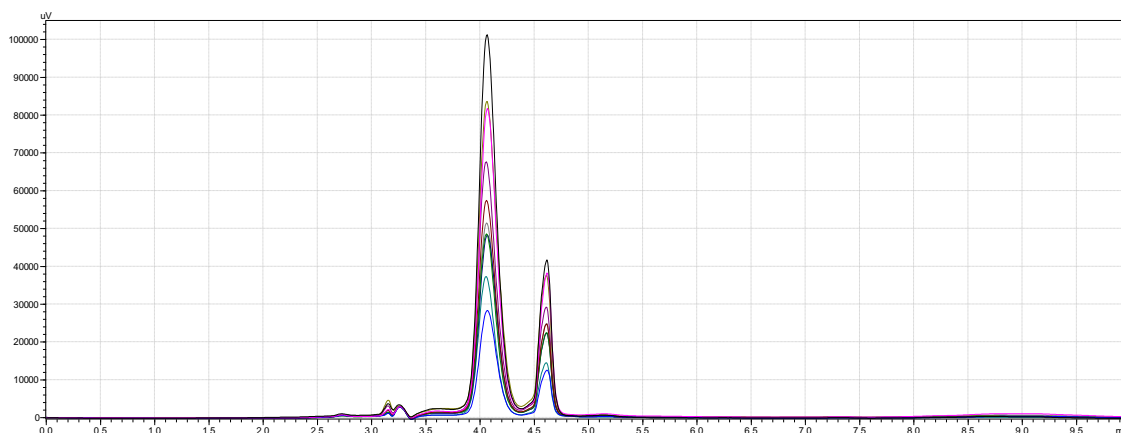
Slika 27. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima treće skupine.

Tablica 8. Koncentracija luteina u uzorcima treće skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	940004	75553	3.58479	3.58479
2	1244090	104210	4.74725	4.74725
3	726956	58271	2.77035	2.77035
4	506264	42115	1.92669	1.92669
5	1196954	101187	4.56706	4.56706
6	1137596	97068	4.34014	4.34014
7	825004	69539	3.14517	3.14517
8	904064	75973	3.44740	3.44740
9	1022491	86787	3.90012	3.90012
10	943732	77760	3.59904	3.59904
srednja vrijednost	993432.33	82927.56	3.789	3.789
SD	172687.24	15483.26	0.660	0.660
RSD (%)	17.38	18.67	17.423	17.423
interval pouzdanosti (±)	112820.25	10115.54	0.431	0.431

Rezultati dobiveni mjerenjem uzoraka četvrte skupine prikazani su na Slici 28 i u Tablici 9, a rezultati pete skupine prikazani su na Slici 29 i u Tablici 10. U obje skupine su prikazani rezultati dobiveni od uzoraka sa dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva. U statistički

izračun nisu uzete vrijednosti uzoraka 3 i 9 u četvrtoj skupini, te uzoraka 1, 7 i 8 u petoj skupini jer odstupaju od ostalih vrijednosti unutar skupina.



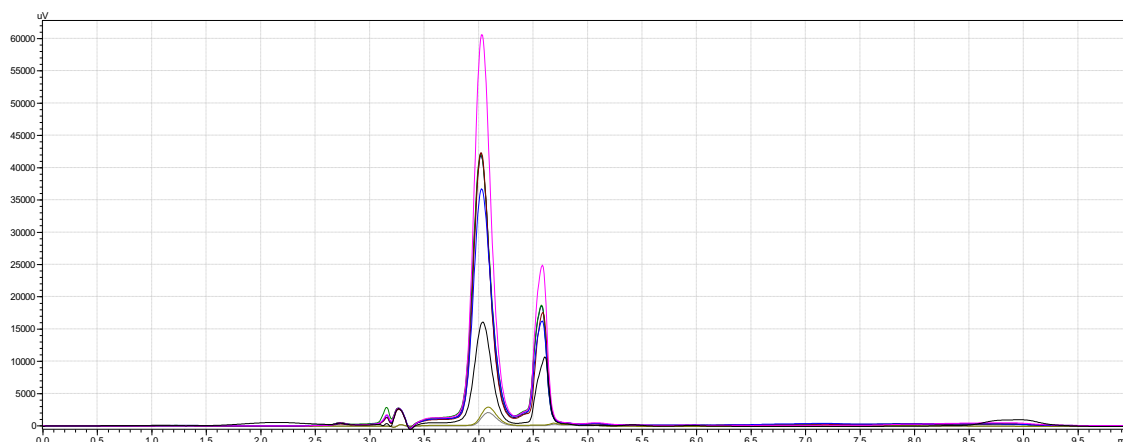
Slika 28. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima četvrte skupine.

Tablica 9. Koncentracija luteina u uzorcima četvrte skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	1206513	101382	4.60360	4.60360
2	982199	81836	3.74609	3.74609
3	349681	28625	1.32810	1.32810
4	692051	57616	2.63691	2.63691
5	581205	48814	2.21317	2.21317
6	598126	48528	2.27786	2.27786
7	1061666	83506	4.04988	4.04988
8	619700	51692	2.36033	2.36033
9	449334	37608	1.70905	1.70905
10	844435	67715	3.21945	3.21945
srednja vrijednost	823236.88	67636.13	3.138	3.138
SD	238255.17	19516.62	0.911	0.911
RSD (%)	28.94	28.86	29.021	29.021
interval pouzdanosti (±)	165099.38	13524.08	0.631	0.631

Kako su uzorci četvrte i pete skupine s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava, i dobiveni rezultati se dosta razlikuju jer su se nesilice slobodno kretale dvorištem te se zbog toga nije kontrolirala njihova ishrana. U četvrtoj skupini, koncentracija luteina iznosi 3,138 mg/100 g žumanjka dok je kod pete skupine koncentracija manja i iznosi 2,135 mg/100 g žumanjka, no vrijednost relativnog standardnog odstupanja kod četvrte skupine je znatno veća (29,02 %) u odnosu na petu skupinu ali i sve ostale skupine u ovom istraživanju. Razlog tome

možemo naći u već ranije spomenutom načinu ishrane nesilica ali i metabolizam svake nesilice.

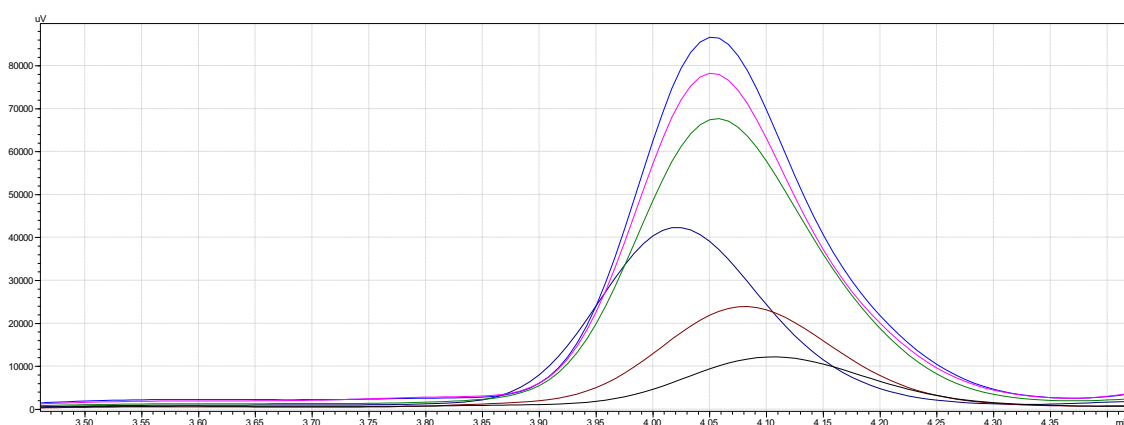
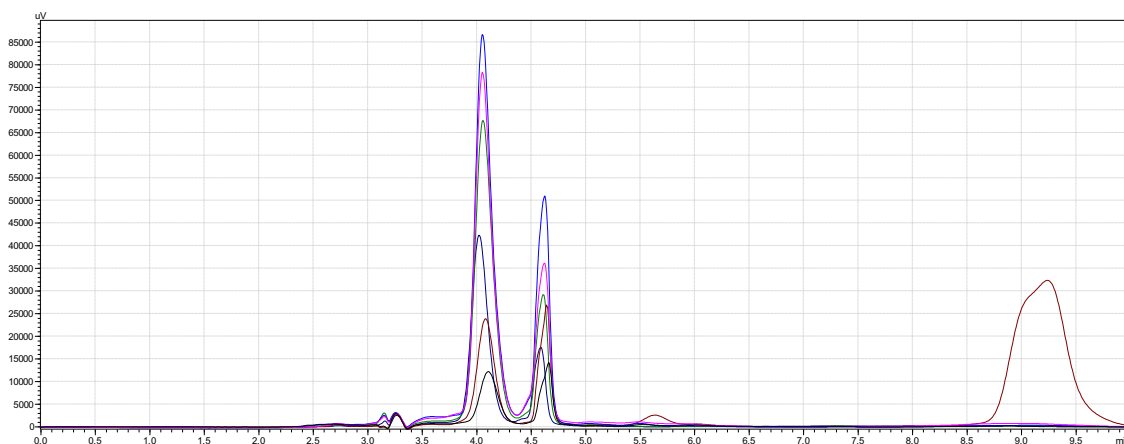


Slika 29. Kromatogrami dobiveni mjerenjem koncentracije luteina u uzorcima pete skupine

Tablica 10. Koncentracija luteina u uzorcima pete skupine.

Uzorak	površina pika (mV/s)	visina pika (mV)	mg/L (ppm)	mg/100 g žumanjka
1	211189	16535	0.79867	0.79867
2	724622	60853	2.76143	2.76143
3	484871	36938	1.84490	1.8449
4	511379	42553	1.94624	1.94624
5	550754	42395	2.09676	2.09676
6	532133	42153	2.02558	2.02558
7	29120	2822	0.10265	0.10265
8	21002	2051	0.07162	0.07162
srednja vrijednost	560751.80	44978.40	2.135	2.135
SD	94826.16	9181.37	0.363	0.363
RSD (%)	16.91	20.41	16.979	16.979
interval pouzdanosti (±)	83117.27	8047.68	0.318	0.318

Usporedba koncentracija luteina po skupinama prikazana je na Slici 30. i u Tablici 11.



Slika 30. Usporedba kromatograma svih skupina (kontrolna skupina — , Skupina 1 — , Skupina 2 — , Skupina 3 — , Skupina 4 — , Skupina 5 —).

Tablica 11. Usporedba koncentracija luteina prema skupinama.

Skupina	mg/100 g žumanjka
Kontrola	0,644
1	1,179
2	3,661
3	3,789
4	3,138
5	2,135

Najniža koncentracija luteina određena je u uzorcima kontrolne skupine, dok su najveće vrijednosti dobivene u uzorcima jaja koja su dobivena od nesilica koje su hranjene krmnom smjesom u koju je dodan lutein, odnosno lutein uz druge nutrice. Veće koncentracije luteina u uzorcima 4. i 5. skupine posljedica su slobodne ishrane nesilica.

5. ZAKLJUČAK

Lutein je prirodni biljni pigment koji pripada skupini karotenoida, odnosno ksantofila. Neophodan je za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Njegov nedostatak najčešće uzrokuje poremećaje vida poput staračke degenerativne žute pjege. Ljudski organizam ga ne može sintetizirati *de novo* već se mora unositi hranom. Budući da je lutein lipofilna molekula, bioiskoristivost luteina je znatno manja iz voća i povrća nego iz žumanjka jajeta. Masovna proizvodnja namirnica kao što su jaja nesilica rezultirala je padom kvalitete i manjim udjelom korisnih nutrijenata stoga se brojnim istraživanjima nastoji poboljšati hrana nesilica što u pravilu poboljšava nutritivnu vrijednost jaja.

U ovome radu se analizirao utjecaj sastava krmne smjese kojom su hranjene nesilice na udio luteina u jajima nesilica. Tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti analizirane su sljedeće skupine jaja nesilica: kontrolna skupina, komercijalno dostupna jaja nesilica, jaja nesilica koje su hranjene krmnom smjesom obogaćenom luteinom, jaja nesilica koje su hranjene krmnom smjesom obogaćenom luteinom i drugim nutricinima te 2 skupine jaja nesilica prikupljenih na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu. Najniža vrijednost luteina određena je u kontrolnoj skupini jaja nesilica koje su hranjene standardnom krmnom smjesom (0,644 mg/100 g), nešto viša koncentracija je zabilježena u komercijalno dostupnim jajima (1,179 mg/100 g), no podaci o prehrani tih nesilica nisu dostupni. Najviša koncentracija luteina određena je u skupinama jaja nesilica koje su hranjene krmnom smjesom obogaćenom luteinom i drugim nutricinima (3,661 mg/100 g i 3,789mg/100 g), a neznatno niža koncentracija zabilježena je u jajima s obiteljskog gospodarstva čije nesilice imaju raznoliku ishranu (3,138 mg/100 g i 2,135 mg/100 g). Analizom dobivenih rezultata može se zaključiti da obogaćivanje krmne smjese luteinom rezultira povećanjem koncentracije luteina u žumanjku jajeta.

6. LITERATURA

1. W. Stahl, S. Helmut, *Molecular aspects of medicine*, 24 (2003), 345-351.
2. I. Jang, Y. Ko, S. Kang, S. Kim, M. Song, K. Cho, J. Ham, S. Sohn, *The Journal of Poultry Science*, 51 (2014), 58-65.
3. <https://www.carotene.org/carotenoids/molecular-structure/> (22.svibnja 2020.)
4. T. Chacón-Ordóñez, R. Carle, R. Schweiggert, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99 (2019), 3220-3239.
5. D. Dutta, U. R. Chaudhuri, R. Chakraborty, *African Journal of Biotechnology*, 4 (2005), 1510-1520.
6. H. E. Khoo, K. N. Prasad, K. W. Kong, Y. Jiang, A. Ismail, *Molecules*, 16 (2011), 1710-1738.
7. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281243#section=Top%20->
(22.svibnja 2020.)
8. M. Grčević, Z. Kralik, G. Kralik, D. Galović, M. Pavić, *Poljoprivreda*, 22 (2016), 34-38.
9. M. S. Khan, M. R. Amin, J. S. Florian, *Poultry Science*, 16 (2017), 228-232.
10. O. Sommerburg, J. E. Keunen, A. C. Bird, F. J. Van Kuijk, *British Journal of Ophthalmology*, 82 (1998), 907-910.
11. R. Huopalahti, M. Anton, R. López-Fandiño, R. Schade, *Bioactive egg compounds*, Springer, Berlin (2007).
12. K. Zaheer, *CYTA-Journal of Food*, 15 (2017), 474-487.
13. <https://m.happyfresh.my/tesco-extra-cheras/products/happy-egg-omega-plus-lutein-10-eggs-345163/> (28.svibnja 2020.)
14. S. Leeson, L. Caston, *Poultry Science*, 83 (2004), 1709-1712.
15. J. Y. Jeon, K. E. Kim, H. J. Im, S. T. Oh, S. U. Lim, H. S. Kwon, B. H. Moon, J. M. Kim, B. K. An, C. W. Kang, *Food Science of Animal Resources*, 32 (2012), 13-17.
16. M. Skřivan, M. Englmaierová, E. Skřivanová, I. Bubancová, *Czech Journal of Animal Science*, 60 (2015), 89-96.
17. X. Yuan, X. Liu, D. J. McClements, Y. Cao, H. Xiao, *Food & function*, 9 (2018), 4352-4365.

18. <https://www.dsm.com/anh/en/feedtalks/flock-health-influences-carotenoid-yolk.html> (30.svibnja 2020.)
19. <http://www.eyepromise.com/doctors/about/macular-pigment/> (30.svibnja 2020.)
20. J. J. Castenmiller, C. E. West, J. P. Linssen, K. H. van het Hof, A. G. Voragen, *The Journal of nutrition*, 129 (1999), 349-355.
21. M. Holasová, R. Dostalova, V. Fiedlerova, J. Horacek, *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (2009), 188-191.
22. M. Šivel, S. Kráčmar, M. Fišera, B. Klejdus, V. Kubáň, *Czech Journal of Food Sciences*, 32 (2014), 521-525.
23. C. E. Scott, A. L. Eldridge, *Journal of food Composition and Analysis*, 18 (2005), 551-559.
24. A. J. Wenzel, J. P. Sheehan, C. Gerweck, J. M. Stringham, K. Fuld, J. Curran-Celentano, *The Research Journal of the College of Optometrists*, 27 (2007), 329-335.
25. C. L. Sherry, J. S. Oliver, L. M. Renzi, B. J. Marriage, *The Journal of nutrition*, 144 (2014), 1256-1263.
26. K. B. Harikumar, C. V. Nimita, K. C. Preethi, R. Kuttan, M. L. Shankaranarayana, J. Deshpande, *International Journal of Toxicology*, 27 (2008), 1-9.
27. D. Džambić, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, Završni rad. Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Electrical Engineering, Computer Science and Information Technology Osijek. Department of Electromechanical Engineering, Chair of Fundamentals of Electrical Engineering and Measurements., 2019.
28. M. Mihoci, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 64 (2015.), 683-685.
29. M. Roe, H. Pinchen, S. Church, P. Finglas, *Nutrient analysis of eggs*, Department of Health, London (2013).

7. ŽIVOTOPIS

Matea Marunica

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

Osobni podaci:

Adresa: Kralja Tomislava 148, 35212 Garčin

e-mail adresa: matea.marunica@gmail.com

telefon: 0997803224

Datum i mjesto rođenja: 22.11.1996, Slavonski Brod

Obrazovanje :

2018.-2020. Sveučilišni 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 „Matija Mesić“ Slavonski Brod, smjer: Opća gimnazija

2003.-2011. Osnovna škola Vjekoslava Klaića, Garčin

Ostale aktivnosti:

2020. Sudjelovanje na međunarodnom znanstveno-stručnom skupu 18. Ružičkine dani s posterskim priopćenjem

O. Galović, M. E. Nikolić, L. Dornjak, M. Marunica, Z. Kralik: Sample preparation and analysis of nutricines content in table eggs

2019. Sudjelovanje na konferenciji „Dani mladih istraživača“

2019. Sudjelovanje na Smotri Sveučilišta J. J. Strossmayera