

# Ekstrakcija vitamina E iz jaja obogaćenih vitaminom E uz pomoć ultrazvuka

---

**Poredski, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:671659>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**

*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za kemiju**  
**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Petra Poredski**  
**Ekstrakcija vitamina E iz jaja obogaćenih vitaminom E uz pomoć ultrazvuka**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za kemiju**  
**Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer**

**Petra Poredski**  
**Ekstrakcija vitamina E iz jaja obogaćenih vitaminom E uz pomoć ultrazvuka**

**Diplomski rad**

**Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović**  
**Neposredni voditelj: dr. sc. Manuela Grčević**

**Osijek, 2021.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****EKSTRAKCIJA VITAMINA E IZ JAJA OBOGAĆENIH VITAMINOM E UZ  
POMOĆ ULTRAZVUKA****Petra Poredski****Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera****Mentor:** doc. dr. sc. Olivera Galović**Neposredni voditelj:** dr. sc. Manuela Grčević**Sažetak:**

Kao vitamin koji pripada skupini vitamina topljivih u mastima, vitamin E je od izuzetne važnosti za zdravlje ljudskog organizma. Glavna i najvažnija uloga mu je kao antioksidans. Svojim djelovanjem sprječava razaranje membrane, uništavanja singlet molekularni kisik, sudjeluje u metabolizmu kolesterola, održava imunološki sustav, itd. Glavni cilj ovog istraživanja bio je ekstrahirati vitamin E iz jaja obogaćenih vitaminom E uz pomoć ultrazvuka te odrediti koncentraciju vitamina E u jajima koja su obogaćena vitaminom E korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Prije analize realnih uzoraka uspoređena je klasična ekstrakcija tekuće-čvrsto i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ispitan je utjecaj amplitude na uspješnost UZV ekstrakcije te vrijeme ekstrakcije. Kod određivanja koncentracije vitamina pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, ispitan je utjecaj temperature. Odabrana je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz amplitudu 70 % te vremenom ekstrakcije 1 sat. Koncentracija vitamina E određivana je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pri 40 °C. Koncentracija vitamina E određivana je u komercijalno dostupnim jajima, jajima dobivenima od nesilica s dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva te jajima dobivenima od nesilica hranjenih krmnom smjesom s dodatkom vitamina E. Dobiveni rezultati pokazuju da je najveća koncentracija vitamina E prisutna u jajima dobivenima od nesilica hranjenih krmnom smjesom s dodatkom vitamina E, nešto niža koncentracija vitamina E određena je u jajima dobivenima od nesilica s dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva, dok je najniža koncentracija određena u komercijalno dostupnim jajima. Usporedba dobivenih rezultata mjerenja ukazuje da će dodatak vitamina E u hranu nesilica povećati njegov sadržaj u jajima.

**Diplomski rad obuhvaća:** stranica: 44, slika: 10, tablica: 14, literaturnih pregleda: 41**Jezik izvornika:** Hrvatski**Ključne riječi:** Vitamin E, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, ultrazvučna ekstrakcija**Rad prihvaćen:** 6. rujan 2021.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. doc.dr.sc. Anamarija Stanković, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentor i član
3. doc.dr.sc. Ana Amić, član
4. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, zamjena člana

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

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Department of Chemistry****Graduate Study of Chemistry****Scientific Area: Natural Sciences****Scientific Field: Chemistry****ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION OF VITAMIN E FROM EGGS  
ENRICHED WITH VITAMIN E****Petra Poredski****Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.**Immediate supervisor:** Manuela Grčević, Ph.D.**Abstract:**

As a vitamin that belongs to a group of fat-soluble vitamins, vitamin E is extremely important to human health. Its main and the most important role is as an antioxidant. It prevents membrane destruction, destroys single molecular oxygen, participates in cholesterol metabolism, maintains the immune system, etc. The main goal of this study was to extract vitamin E from eggs enriched with vitamin E with ultrasound-assisted (UA) extraction, and to determine its concentration by using high performance liquid chromatography (HPLC). Before analyzing the real samples, the classical liquid-solid extraction and UA extraction were compared, the influence of the amplitude on the successes of the UA extraction and the extraction time were examined. The influence of temperature during HPLC determination of vitamin E was examined. UA extraction with an amplitude of 70%, extraction time of 1 hour and temperature 40 °C during HPLC analysis was selected. Vitamin E concentration was determined in commercially available eggs, eggs obtained from two family farms, and eggs obtained from laying hens fed with a mixture of vitamin E. The results show that the highest concentration of vitamin E is present in eggs obtained from laying hens fed with a mixture supplemented with vitamin E, a slightly lower concentration of vitamin E was determined in eggs obtained from laying hens from two family farms, while the lowest concentration was determined in commercially available eggs. A comparison of the obtained measurement results indicates that the addition of vitamin E to the feed of laying hens will increase its content in eggs.

**Thesis includes:** *pages: 44, figures: 10, tables 14, references: 41***Original in:** Croatian**Keywords:** Vitamin E, High – performance liquid chromatography, Ultrasound extraction**Thesis accepted:** 6 September, 2021.**Reviewers:**

1. Anamarija Stanković, Ph.D., assistant prof., president
2. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof., mentor and member
3. Ana Amić, Ph.D., assistant prof., member
4. Martina Šrajter Gajdošik, Ph.D., assistant prof., alternate member

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

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

## Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....   | 2  |
| 2.1. Vitamin E .....  | 2  |
| 2.2. Fizikalno-kemijska svojstva $\alpha$ – tokoferola .....                                | 3  |
| 2.3. Izvori vitamina E.....   | 3  |
| 2.4. Biološka aktivnost vitamina E.....   | 4  |
| 2.5. Analiza vitamina E .....   | 6  |
| 2.5.1. Kemijske metode određivanja vitamina E.....  | 7  |
| 2.5.1.1. Kromatografske metode .....  | 7  |
| 2.5.1.1.1. Plinsko – tekućinska kromatografija .....  | 8  |
| 2.5.1.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....                            | 10 |
| 2.5.2. Spektrofotometrija.....  | 11 |
| 2.6. Ekstrakcija.....   | 12 |
| 2.6.1. Disperzivno tekućinsko-tekućinska mikroekstrakcija.....                              | 14 |
| 2.6.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....  | 15 |
| 2.7. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....                                     | 17 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 23 |
| 3.1. Kemikalije.....  | 23 |
| 3.2. Pribor i instrumentacija.....  | 23 |
| 3.3. Odabir uzoraka za analizu .....  | 24 |
| 3.4. Priprema uzoraka za analizu .....  | 25 |
| 3.4.1. Odabir parametara ekstrakcije.....   | 26 |
| 3.4.1.1. Odabir postupka ekstrakcije .....  | 26 |
| 3.4.1.2. Odabir vremena ekstrakcije.....  | 26 |
| 3.4.1.3. Utjecaj temperature na rezultate analize.....                                      | 27 |
| 3.4.1.4. Utjecaj vremena ekstrakcije i temperature .....                                    | 27 |
| 3.4.1.5. Utjecaj amplitude UZV .....  | 27 |
| 3.5. Analiza .....  | 27 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | 29 |
| 4.1. Odabir postupka ekstrakcije .....  | 29 |
| 4.3. Utjecaj temperature na rezultate analize .....   | 30 |
| 4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije i temperature .....  | 31 |
| 4.5. Utjecaj amplitude UZV .....  | 32 |
| 4.6. Parametri ekstrakcije i analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti..... | 33 |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| 4.7. Analiza realnih uzoraka..... | 34        |
| <b>5. ZAKLJUČAK.....</b>          | <b>40</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>        | <b>41</b> |
| <b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>          | <b>44</b> |



## 1. UVOD

Od latinske riječi „*vita*“ što znači život, te riječi „*amini*“, dolazi riječ „vitamin“. Esencijalni organski spojevi koje je potrebno redovito unositi u organizam kako bi on mogao normalno funkcionirati. Označavanje vitamina, koje poznajemo i danas, započelo je slovima (npr. A, D, K, E, itd.), a kako su se otkrivali strukturno srodni spojevi, dodavali su se brojevi (npr. D<sub>3</sub>). Često uz oznake slova možemo naći i naziv vitamina koji upućuje na njegovu strukturu, funkciju ili prirodni izvor (npr. kalciferol – potiče apsorpciju kalcija) [1].

Kako je već navedeno, vitamini su za ljudski, ali i životinjski organizam esencijalni spojevi. Ljudski organizam nije sposoban sam proizvesti vitamine te ih je stoga potrebno redovito unositi u organizam pravilnom prehranom. Ono što organizam može je da preteče vitamina koje unosimo hranom preradi u vitamine. Primjer su: provitamin β–karotena organizam može preraditi u vitamin A, vitamin D<sub>3</sub> može nastati iz 7–dehidrokolesterola ako kožu obasjamo ultraljubičastim zrakama [1].

Dnevne potrebe za vitaminima se razlikuju, a najviše ovise o spol, veličini tijela, te tjelesnoj aktivnosti.

Osnovna, ali i najpoznatija podjela vitamina je:

- vitamini topljivi u vodi,
- vitamini topljivi u mastima.

U vitamine topljive u vodi ubrajamo vitamine B skupine i vitamin C. Karakteristično za ovu skupinu vitamina je da se izlučuju putem bubrega te se stoga kratko zadržavaju u organizmu. U vitamine topljive u mastima ubrajamo vitamine A, D, E i K. Ove vitamine karakteriziraju specifične uloge, npr. vitamin K je od izuzetne važnosti u sintezi protrombina i drugih čimbenika koji utječu na zgrušavanje krvi, vitamin E je poznat kao antioksidans, vitamin A ima sudjeluje u stvaranju vidnih pigmenata i u rastu stanica, dok vitamin D utječe na apsorpciju kalcija, fosfata, te mineralizaciju kostiju i zubi [1].

Poznata su tri poremećaja u unosu vitamina [1]:

- avitaminoza – potpuni nedostatak vitamina,
- hipovitaminoza – blaži oblik nedostatka vitamina,
- hipervitaminoza – povišena razina vitamina.

## 2. LITERATURNI PREGLED

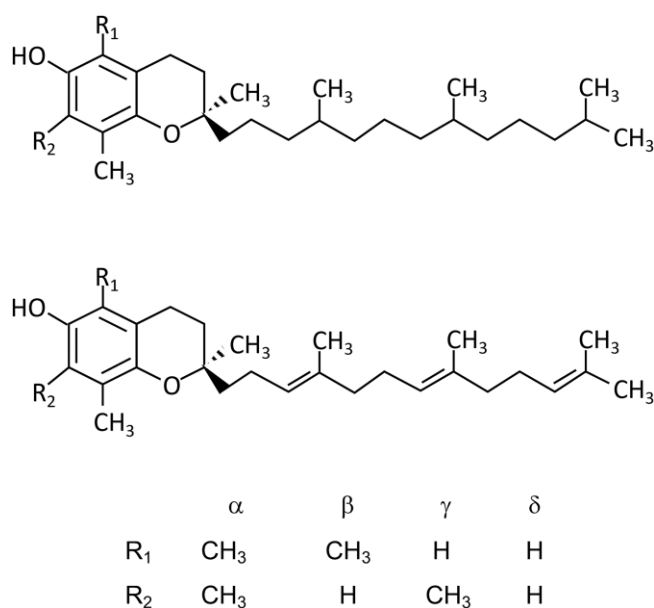
### 2.1. Vitamin E

Vitamin E jedan je od vitamina topljivih u mastima. Esencijalni je vitamin, što znači da ga je potrebno redovito unositi u organizam.

Pojam „vitamin E“ obuhvaća skupinu spojeva koji se nazivaju tokokromanoli. Toj skupini pripada osam spojeva (vitamera). Vitameri su strukturno slične molekule koje se mogu prema potrebi transformirati. Osam spojeva podijeljeno je u dva razreda:

1. Tokoferoli – zasićeni bočni lanac sa 16 ugljikovih atoma,
2. Tokotrienoli (trienoli) – nezasićeni bočni lanac sa 16 ugljikovih atoma.

Slika 1 prikazuje osnovnu strukturu vitamera. Fenolna skupina je vezana na kromanolni prsten te ima pričvršćen izoprenoidni bočni lanac. Svaki razred obuhvaća po četiri vitamera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ). Svojstva ova dva razreda se razlikuju, ali struktura im je zajednička [2].



Slika 1: Struktura tokoferola i tokotrienola [3].

Osim toga, na slici 1 je vidljivo da tokoferoli imaju zasićeni bočni lanac. Tokotrienoli imaju tri nezasićene veze u bočnom lancu na položaju C3', C7' i C11', pri čemu su veze na C3' i C7' transkonfiguracije.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - oblici razlikuju se međusobno po broju i položaju metilnih skupina na prstenu kromanola.  $\alpha$ -tokoferol i  $\alpha$ -tokotrienol imaju tri metilne skupine

koje se nalaze na položajima C5, C7 i C8 u kromanolnom prstenu.  $\beta$ -tokoferol i  $\beta$  tokotrienol, te  $\gamma$ -tokoferol i  $\gamma$ -tokotrienol koji imaju dvije metilne skupine na položaju C5, odnosno C7 i C8 u kromanolnom prstenu.  $\delta$ -tokoferol i  $\delta$ -tokotrienol imaju po jednu metilnu skupinu na položaju C8 u kromanolnom prstenu [4].

Jedino  $\alpha$ -tokoferol ima biološku aktivnost. Tokoferoli i tokotrienoli koji su prirodno prisutni u hrani imaju RRR stereokemiju. Općenito, R i S se koriste kako bi se odredila stereoizomerija asimetričnih molekula kao što je vitamin E. Biološki najaktivniji oblik je RRR  $\alpha$ -tokoferol, koji se nekada zvao d- $\alpha$ -tokoferol [2].

## 2.2. Fizikalno-kemijska svojstva $\alpha$ -tokoferola

IUPAC ime  $\alpha$ -tokoferola je (2*R*)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4*R*,8*R*)-4,8,12,trimetiltridecil]-3,4-dihidrokromen-6-ol. Iz naziva proizlazi molekulska formula, C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>. Molekulska masa iznosi 430,7 g/mol. Blago žute boje. Gotovo bezmirisno, bistro i viskozno ulje. Pri sobnoj temperaturi nije topljiv u vodi, dok je dobro topljiv u etanolu i aprotičnim otapalima. Gustoća pri 25 °C iznosi 0,950 g/cm<sup>3</sup>. Nestabilan na UV svjetlosti. Maksimalna apsorpcija UV zraka je pri 292 nm u etanolu. Fluorescencija pobude je od 290 nm do 295 nm, dok fluorescencija emisije je od 320 nm do 335 nm [4].

## 2.3. Izvori vitamina E

Vitamin E u biljnoj i životinjskoj hrani može biti prisutan u različitim oblicima. Najbogatijim i glavnim izvorom vitamina E, smatraju se biljna ulja. Biljna ulja, kao što su suncokretovo ulje, maslinovo ulje, repičino ulje sadrže znatnu količinu  $\alpha$  tokoferola. Dok sojino ulje i kukuruzno ulje uz nešto manju količinu  $\alpha$ -tokoferola sadrže i  $\gamma$ -tokoferol. Salatni preljevi, majoneza, margarin, maslac od kikirikija te ostale namirnice dobivene od biljnih ulja, odnosno orašastih plodova izvrstan su izvor vitamin E. U dobar izvor vitamina E pripadaju žitarice cjelovitog zrna, mahunarke te voće i povrće. Kada bi biljku podijelili na klorofilni i neklorofilni dio, najveća količina  $\alpha$ -tokoferola, uz nešto manji udio  $\gamma$ -tokoferola nalazi se u zelenom dijelu biljke, odnosno u klorofilu.  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferoli nalaze se u

neklorofilnom dijelu biljke. Zrna mahunarki, kao i različite žitarice (pšenica, ječam, zob i riža) dobar su izvor tokotrienola [2].

Vitamin E, osobito,  $\alpha$ -tokoferol prisutan je u masnim tkivu životinja. No, u usporedbi s biljnim proizvodima, proizvodi životinjskog podrijetla predstavljaju inferioran izvor vitamina E [2].

Važno je naglasiti, kako se preradom hrane može izgubiti dio vitamina. Tako se tokoferoli mogu oksidirati prilikom duže izloženosti na zraku. Isto tako, izlaganje vitamina svjetlu i toplini može dovesti do njegovog uništavanja [2].

#### 2.4. Biološka aktivnost vitamina E

Preporučena dnevna količina (engl. *Recommended Dietary Allowances*, RDA) vitamina i minerala, obzirom na spol, dob, stanje (razdoblje trudnoće, vrijeme laktacije), izražava se u internacionalnim jedinicama (i.j.), miligramima (mg) ili mikrogramima ( $\mu$ g) [5].

RDA vitamina E za odrasle žene i muškarce iznosi 15 mg  $\alpha$ -tokoferola. Za djecu u dobi od 1 do 3 godine RDA iznosi 6 mg, dok za djecu od 4 do 8 godina iznosi 7 mg. U razdoblju puberteta, RDA je nešto viši. Za mlade od 9 do 13 godina iznosi 11 mg, dok za mlade od 14 do 18 godina iznosi 15 mg. Za dojenčad je utvrđen određen unos vitamin E. RDA i potrebe za vitaminom E kod dojenčadi temelje se na unosu prirodnog oblika  $\alpha$ -tokoferola i sintetičkih ALL-RAC 2R – stereoizomernih oblika (RSR, RRR i RSS)  $\alpha$ -tokoferola koji se koriste za tificiranu hranu i nadomjeske vitamina. 1500 IU RRR  $\alpha$ -tokoferola odgovara količini od 1000 mg  $\alpha$ -tokoferola [2].

Apsorpcija vitamina E odvija se ponajprije u jejunumu, pasivnom difuzijom. Da bi došlo do emulgiranja, topljenja i stvaranja micela potrebne su žučne soli, koje isto tako omogućuju širenje vitamina enterocitne membrane. Apsorpciju vitamina E poboljšava istovremena apsorpcija i probava lipida. Procjenjuje se da je apsorpcija vitamina E tada uspješnija za 20 % do 80 %. Apsorbirani vitamin E u enterocitu se ugrađuje u hilomikrone za daljnji transport kroz limfu do cirkulacije. Tijekom transporta, moguć je prijenos vitamina E među lipoproteine plazme, kao što su HDL i LDL, koji ujedno sadrže i najviše koncentracije vitamina. Smatra se da se po LDL-u nalazi 5–9  $\alpha$ -tokoferol molekula, dok je koncentracija

tokotrienola u istim lipoproteinima manja. Jetra se opskrbljuje vitaminom E pomoću hilomikrona. Smatra se, da se samo RRR  $\alpha$ -tokoferol ugrađuje u lipoproteine niske gustoće (VLDL). Kako VLDL omogućuje distribuciju vitamina u ostala tkiva za prijenos tokoferola, konkretno, RRR  $\alpha$ -tokoferola u VLDL-ove potreban je enzim  $\alpha$ -tokoferol transfer protein ( $\alpha$  TTP).  $\alpha$  TTP se proizvodi u jetri, dok njegov nedostatak može dovesti do nedostatka vitamina E. Zbog svoje specifičnosti, VLDL-ovi slabo prepoznaju druge oblike vitamina te ih ne otpuštaju u cirkulaciju. Prijenos vitamina E s lipoproteina na membrane olakšava i protein za prijenos fosfolipida [2].

Vitamin E se u staničnoj membrani orijentira tako da je kromanolni prsten usmjeren prema površini membrane, dok je izoprenoidni bočni lanac usmjeren prema unutrašnjosti stanice. Više od 90 % vitamina E, u neesterificiranom obliku nalazi se u kapljicama masti u masnom tkivu, dok se manji dio nalazi u jetri, srcu, plućima, mišićima, slezeni, mozgu te nadbubrežnoj žlijezdi. Kako vitamin E pripada vitaminima topljivima u masti, tako se njegova koncentracija u masnom tkivu linearno povećava s dozom vitamina E, dok će njegova koncentracija u ostalim tkivima ostati konstanta ili se sporo povećavati. Iako se njegovo koncentracija u masnom tkivu brzo povećava, njegovo oslobađanje iz masnog tkiva je vrlo sporo, čak i onda kada je nedovoljan unos vitamina E u organizam.

Glavna uloga vitamina E je održavanje cjelovitosti membrane. Mehanizam kojim štiti membrane od razaranja je njegova sposobnost sprječavanje oksidacije nezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u fosfolipidnim membranama. Tkiva sa staničnim membranama osjetljiva su na oksidaciju (npr. mozak, pluća, eritrociti). Kako sprječava oksidaciju, vitamin E se smatra antioksidansom.

Vitamin E je antioksidans.  $\alpha$  – tokoferol predstavlja biološki najaktivniji oblik vitamina E, koji ujedno ima najvažniju ulogu u antioksidativnom djelovanju.  $\alpha$ -tokoferol može zaustaviti reakcije slobodnih radikala te uništiti singlet molekularnog kisika,  $^1\text{O}_2$ .

Fenolna skupina na kromanolnom prstenu omogućava doniranje vodikovih iona slobodnim radikalima. Za razliku od  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferola,  $\alpha$ -tokoferol je najdjelotvorniji u doniranju vodikovih iona. Vodikovi ioni  $\alpha$ -tokoferola, učinkovito i brzo reagiraju sa slobodnim radikalima, prije nego što oni unište staničnu membranu.

Uzrok nastanka slobodnih radikala su različiti metabolički procesi, enzimske reakcije, kao i izlaganje UV zrakama. Slobodni radikali započinju seriju reakcija koje vitamin E može prekinuti. Reakcije se odvijaju u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija.

Još jedna važna uloga vitamina E kao antioksidansa je uništavanje singlet molekularnog kisika.  $^1\text{O}_2$  nastaje peroksidacijom lipidne membrane, fotokemijskim reakcijama ili

enzimskim reakcijama. Lako reagira s organskim molekulama, kao što su bjelančevine, lipidi ili DNA te na taj način može uništiti stanične komponente. Način na koji vitamin E uništava  $^1\text{O}_2$  povezano je s hidroksilnom skupinom na kromanolnom prstenu. Kao i kod uništavanja slobodnih radikala, tako i ovdje, najdjelotvorniji je  $\alpha$ -tokoferol.

Osim ovih dvaju važnih uloga, vitamin E, tj. tokotrienoli imaju veliku ulogu u metabolizmu kolesterola [2].

Osim antioksidativne uloge, vitamin E ima veliku važnost u metabolizmu kolesterola, održavanju imunološkog sustava, pravilnom razvoju retine oka, održavanju normalne funkcije spolnih žlijezda, a važan je i za pravilan rad mišića te integritet središnjeg živčanog sustava [6].

Nakon metabolizma, vitamin E se izlučuje pomoću žuči putem izmeta, a jednim djelom se izlučuje mokraćom [2].

Nedostatak vitamina E vrlo je rijedak. Poremećaji malapsorpcije masti, poremećaji hepatobilijarnog sustava, genetski poremećaji u lipoproteinima ili u proteinima za prijenos  $\alpha$  – tokoferola primjer su mogućih uzroka nedostatka vitamina E. Simptomi koji upućuju na nedostatak vitamina E su bol i slabost u mišićima, poremećaji vida, hemolitička anemija, nakupljanje ceroidnog pigmenta, degenerativni neurološki problemi. Koncentracije ukupnog tokoferola u plazmi u odnosu na ukupne lipide kod odraslih osoba smanjuju se na  $< 5 \mu\text{g/mL}$  ili  $< 0,8 \text{ mg/g}$  s nedostatkom vitamina E [2].

## 2.5. Analiza vitamina E

Kada se govori o analizi vitamin E, priprema uzorka predstavlja najzahtjevniji i najvažniji korak analize, jer se u ovom koraku mogu napraviti greške Kolorimetrija, fluorometrija, plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), te spregnute tehnike kao što su GC–MS i HPLC–MS, primjer su analitičkih metoda koje se koriste za analizu vitamina E.

Sjedinjene Američke Države i Europska farmakopeja preporučuju plinsku kromatografiju za određivanje vitamina E, dok Japanska farmakopeja preporučuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti za određivanje vitamina E. Iako, i GC i HPLC imaju određene zasluge pri određivanju vitamina E, trenutno se najviše primjenjuje HPLC metoda [4].

### 2.5.1. Kemijske metode određivanja vitamina E

19. i 20. stoljeće obilježeno je prvim istraživanjima vitamina, tj. istraživala se biološka aktivnost vitamina. Metode koje su se tada koristile, uvelike su pridonijele razvoju novih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje vitamina. Korištenjem određene metode za određivanje vitamina u uzorcima, ta ista metoda se ne može koristiti za dobivanje informacija o biološkoj aktivnosti vitamina. Fizikalno–kemijske metode pogodne za određivanje sastava vitamina su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC–MS), tankoslojna kromatografija (TLC) te kolorimetrijska određivanja. Vitamini se mogu određivati iz različitih proizvoda te je moguće različito prikazivanje sadržaja vitamina. Stoga je uvedena mjerna jedinica koja je odobrena prema jedinstvenim kriterijima – internacionalna jedinica (I.J., engl. *International Unit*, I.U.) [7]. Internacionalna jedinica je mjerna jedinica za količinu pojedine tvari, a utemeljena je na izmjerenoj biološkoj aktivnosti [8].

Nove analitičke metode koje karakterizira kraće vrijeme dobivanje rezultata, točnost, preciznost te neovisnost o početnom uzorku, i dalje motivira znanstvenike za nova otkrića [7].

#### 2.5.1.1. Kromatografske metode

Kromatografija je jedna od fizikalno–kemijskih metoda separacije, tj. odjeljivanja. Sastojci smjese se odvajaju na način da se raspoređuju između dviju faza, pokretne i nepokretne faze, sastojci se međusobno ne miješaju te se kreću u određenom smjeru [9, 10]. Nepokretna faza, poznata kao i stacionarna faza, može biti čvrsta tvar ili kapljevina koja se nanosi na površinu plohe ili se nanosi u cijev. Osim prema polarnosti, kemijskoj strukturi, sorbenski koji mogu tvoriti nepokretnu fazu, mogu biti polarni i nepolarni anorganski sorbensi, polarni organski sorbensi te polarne i nepolarne vezane faze [10]. Pokretna faza, poznata kao i mobilna faza, može biti plin, tekućina ili fluid. Mobilna faza prolazi kroz nepokretnu fazu ili uzduž nepokretne faze u određenom smjeru. Sastojke smjese kroz nepokretnu fazu nosi eluens [11].

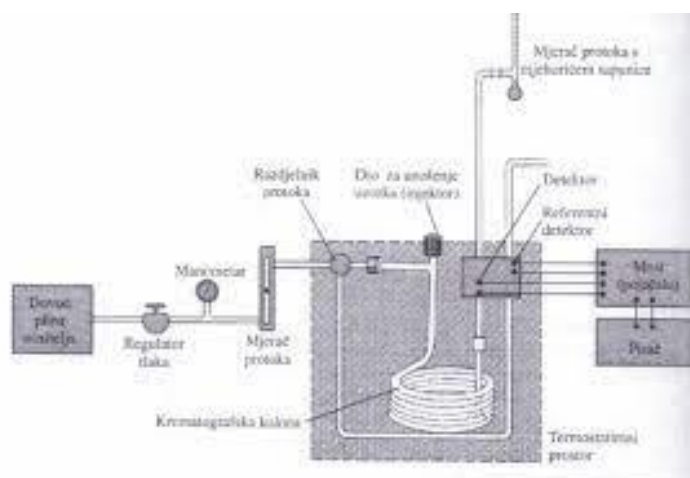
Mogu se naći različite podjele kromatografija. Tako na primjer, prema obliku kromatografske podloge razlikujemo plošnu i kolonsku kromatografiju. Dok prema fizikalnom stanju pokretne i nepokretne faze razlikujemo plinsko–čvrstu kromatografiju (GSC), plinsko–tekućinsku kromatografiju (GLC), tekućinsko–tekućinsku kromatografiju (LLC), tekućinsko–čvrstu kromatografiju (LSC) i plinsko–tekućinsku razdjelnu kromatografiju (GLPC). Adsorpcijska, afinitetna, ionsko–izmjenjivačka, kromatografija isključenjem i razdjelna predstavljaju kromatografije prema mehanizmu odjeljivanja [9]. Osim za odjeljivanje, kromatografske metode također se mogu koristiti za identifikaciju, kao i za kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka koji su prisutni u određenim smjesama [11].

#### 2.5.1.1.1. Plinsko–tekućinska kromatografija

Plinsko–tekućinska kromatografija (engl. *Gas–liquid chromatography*, GLC) analitička je tehnika koja se najčešće primjenjuje za odjeljivanje te kvantitativno određivanje složenih smjesa.

Stacionarna faza ove tehnike je tekućina koja je nanesa na površinu čvrstog nosača, adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Mobilnu fazu predstavlja inertni plin (npr. helij) koji eluira sastojke smjese kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom. Brzina kojom analit prolazi kroz kolonu određuje njegov omjer raspodjele mobilne i stacionarne faze.

Uređaj koji se primjenjuje u plinsko–tekućinskoj kromatografiji je plinsko–tekućinski kromatograf (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz plinsko–tekućinskog kromatografa [12].



Glavni dijelovi plinsko–tekućinskog kromatografa su:

- Dovod plina nositelja,
- Sustav za uštrcavanje (unošenje) uzorka,
- Kolona,
- Termostatiranje kolone,
- Detektori.

Dovod plina nositelja – osim već navedenog helija, kao inertni plin mogu se koristiti dušik, argon i vodik. Koji će se plin nositelj koristiti ovisi o izabranom detektoru. Ovdje se još postavljaju regulatori tlaka čija je uloga reguliranje brzine protoka, ventili, mjerači protoka te molekularna sita koja uklanjaju vodu i moguće nečistoće.

Sustav za unošenje uzorka – tekući uzorak koji se unosi u kolonu, treba se unijeti brzo i u maloj količini. Uzorak se unosi kroz membranu, tj. septum u zagrijani dio uređaja pomoću mikrolitarske štrcaljke.

Kolona – najčešće korištene kolone u plinsko–tekućinskoj kromatografiji su kapilarne kolone. Dvije su vrste kapilarnih kolona, mikropunjene kolone i kapilarne kolone. Stacionarna faza kapilarne kolone je jednoliki sloj tekućine koji je debljine nekoliko desetinki milimetara u unutrašnjosti cijevi. Prve kapilarne kolone izrađene su od bakra, čelika, aluminijske ili plastike. Nešto kasnije kapilarne kolone izrađivale su se od stakla čija se površina posebno obrađivala kako bi se na stijenci stakla čvršće vezala stacionarna faza. Kapilarne kolone izrađene od izvučenog kvarca se najčešće koriste. Unutarnji promjer ovih kolona može biti 320–250  $\mu\text{m}$  i 200–150  $\mu\text{m}$ . Manji unutarnji promjer ukazuje na veću moć razlučivanja.

Termostatiranje kolone – koloni, koja se nalazi u termostatom prostoru, potrebna je odgovarajuća temperatura za što precizniji rad. Ovisno o temperaturi vrelišta uzorka i stupnju odjeljivanja ovisi i temperatura kolone.

Detektori – poželjne karakteristike detektora su brz odziv, jednolik odziv, linearni odziv, selektivan odziv te stabilnost. Najčešće korišteni detektori ove kromatografije su detektor toplinske vodljivosti, plamenoionizacijski detektor, detektor apsorpcije elektrona.

Za plinsko–tekućinsku kromatografiju može se reći da ima dvije uloga. Jedna uloga dolazi od plinske kromatografije, odjeljivanje koji je neizbježni dio analize različitih organskih i

biokemijskih smjesa. Druga uloga je analiza. Kvalitativna analiza kod plinsko–tekućinske kromatografije ima puno ograničenja [11].

#### 2.5.1.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High–performance liquid chromatography*, HPLC) je razdjelna kromatografija koja koristi visoke tlakove. Zbog visokih tlakova otapalo ima mogućnost prolaska kroz zatvorenu kolonu ispunjenu finim punjenjem.

Stacionarna faza HPLC–a su čestice manjeg promjera vrlo finih zrna, dok je mobilna faza otapalo čije je uloga da nosi uzorak kroz kolonu.

HPLC se dijeli na:

- Adsorpcijsku kromatografiju,
- Ionsko–izmjenjivačku kromatografiju,
- Kromatografiju isključenjem na osnovi veličine čestica,
- Razdjelnu kromatografiju.

Princip razdvajanja se temelji na međudjelovanju pokretne faze i punjenja kolone, stoga razlikujemo:

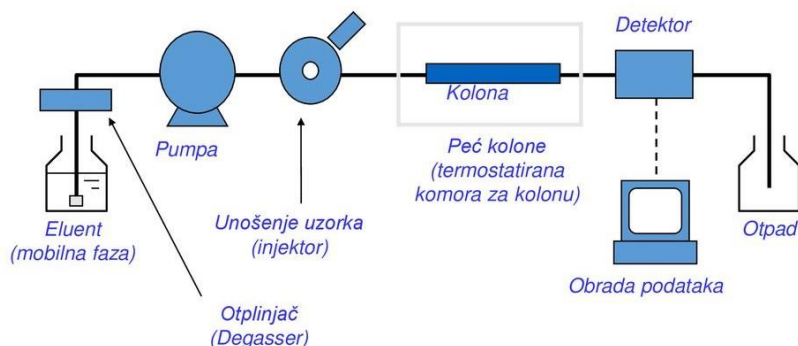
- HPLC normalnih faza – stacionarna faza je polarna, mobilna faza je nepolarna,
- HPLC obrnutih faza – stacionarna faza nepolarna, mobilna faza je polarna [11].

Kada se govori o razdvajanju, ono može biti gradijentno ili izokratno. Gradijentno razdvajanje koristi dva otapala uz promjenjiv pH. Izokratno razdvajanje koristi jedno otapalo ili mješavinu otapala uz nepromjenjiv pH [14].

Glavni dijelovi HPLC–a su:

- Spremnik mobilne faze i sustav za obradu otapala,
- Crpke,
- Sustav za unošenje uzorka,
- Kolone,
- Detektori.

Osim navedenih dijelova, HPLC uređaj sadrži i otplinjač, pumpu te injektor [11, 13]. (Slika 3)



Slika 3: Shematski prikaz HPLC uređaja [15].

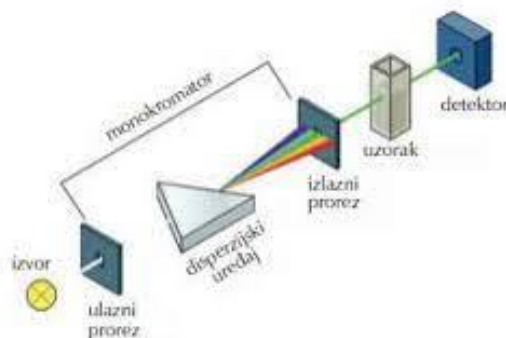
HPLC se odlikuje mnogim prednostima, npr.:

- Relativno visok radni tlak,
- Mali promjer kolone,
- Mali promjer čestica punila,
- Osjetljivi detektori za detekciju male količine analita,
- Visok stupanj separacije,
- Brza analiza [13].

HPLC metoda jedna je od najzastupljenijih metoda današnjice.

### 2.5.2. Spektrofotometrija

Za spektrofotometriju se može reći da je to spektrometrijska metoda pomoću koje se određuje koncentracija tvari u uzorku na temelju izmjerene količine apsorbirane svjetlosti [16]. Pogodna za je kvantitativnu te kvalitativnu analizu prijelaznih metala i organskih molekula. Općenito, princip ove metode je proučavanje interakcija elektromagnetskog zračenja i molekula pomoću karakterističnog apsorpcijskog spektra. Uređaj pomoću kojeg se provodi analiza naziva se spektrofotometar. Spektrofotometar se sastoji od nekoliko osnovnih dijelova: izvor zračenja, selektora valnih duljina, držača uzorka (kiveta), detektora te procesora signala (računalo) (Slika 4). Razlikuju se jednosnopni (engl. *Single – beam*) i dvosnopni (engl. *Double – beam*) spektrofotometri [17].



Slika 4: Shematski prikaz spektrofotometra [18].

Kada je riječ o kvantitativnoj spektrofotometrijskoj analizi, ona se zasniva na Lambert–Beerovom zakonu (jednadžba 1):

$$A = a \cdot b \cdot c \quad (1)$$

U jednadžbi 1,  $A$  označava apsorbanciju (bezdimenzionalna veličina),  $b$  označava duljinu puta zrake kroz uzorak (izražena u cm),  $c$  označava koncentraciju (izražena u mol dm<sup>-3</sup>). Lambert–Beerov zakon prikazuje odnos između apsorbancije i koncentracije [11].

Glavne karakteristike, ujedno i prednosti ove metode su široka primjena, preciznost, točnost, jednostavnost te selektivnost [19].

Jedna od zanimljivih primjena ove metode, je određivanje antioksidanasa kao što je vitamin E iz različitih uzoraka (npr. žitarice, soja, kukuruz). Postupak pomoću kojeg je određena prisutnost antioksidansa, temeljio se na redukciji atoma Mo(VI) u Mo(V) u niskom pH okružju. Produkt reakcije bio je spoj zelene boje. Da bi se odredio isključivo vitamin E, prilikom ekstrakcije se koristio fosfomolibden i heksan. Rezultati su pokazali su da je metoda pogodnu za određivanje vitamina E [20].

## 2.6. Ekstrakcija

Ekstrakcija je poznata još pod nazivima izlučivanje, vađenje, odvajanje. Naziv ekstrakcija može se pronaći u raznim područjima kao što su: medicina (ekstrakcija zuba), matematika (ekstrakcija drugog korijena), dok se u kemiji pod ekstrakcijom podrazumijeva ekstrakcija odabranih tvari iz čvrste ili tekuće smjese pomoću odgovarajućeg otapala (npr. ekstrakcija metala iz rude pomoću kiseline). Prema tome, ekstrakciju možemo definirati kao

prijenos tvari/spoja iz krute ili tekuće smjese u drugo otapalo. Najčešće korištena ekstrakcija u laboratoriju je ekstrakcija tekuće–tekuće koja se odvija u lijevku za odjeljivanje (Slika 5) [21, 22].



Slika 5: Aparatura za ekstrakciju [23]

Na slici 5. vidljiva je aparatura za ekstrakciju. Ona se sastoji od lijevka za odjeljivanje sa brušenim čepom, a kao pomoćna aparatura su stalak, metalni prsten i čaša. Prilikom ekstrakcije, prvo se izmiješaju dva otapala (organsko otapalo i vodeno otapalo), a zatim dolazi do uspostavljanja ravnoteže i nastanka dva sloja. Jedan sloj je organski, a drugi sloj je vodeni. Slojevi će se slagati jedan na drugi na temelju razlike u gustoći. Otopina s manjom gustoćom ležat će na vrhu, dok će gušća otopina ležati na dnu. Tako će nehalogenirana organska otapala plutati na vodenom sloju jer im je gustoća manja od 1 g/mL, dok će halogenirana otapala, čija je gustoća veća od 1 g/mL potonuti ispod vodenog sloja [22].

Da bi opisali raspodjelu otopljenih tvari koja se nalazi u otapalima koja se međusobno ne miješaju, koriste se dvije veličine:

- Koeficijent raspodjele,
- Omjer raspodjele.

Koeficijent raspodjele, ili koeficijent distribucije, predstavlja konstantu ravnoteže koja daje informacije o raspodjeli otopljene tvari u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Dok omjer raspodjele predstavlja omjer analitičkih koncentracija u dva otapala koja se međusobno ne miješaju [11, 24].

Razlikuju se tri tipa ekstrakcije obzirom na razdvajanje između dva otapala koja se međusobno ne miješaju:

- Jednostavna ekstrakcija,
- Iscrpna ekstrakcija,
- Protusmjerna frakcionacija.

Karakteristika jednostavne ekstrakcije je kratko vrijeme trajanja, jednostavnost, kvantitativnost. Aparatura koja se koristi je jednostavna - lijevak za odjeljivanje. Iscrpnu ekstrakciju karakterizira složenija aparatura, organsko otapalo koje prolazi niz procesa te se usmjerava na prolazak kroz vodeni sloj. Protusmjerna frakcionacija je specifičan tip ekstrakcije jer koristi automatske uređaje. Izvodi se veliki broj uzastopnih ekstrakcija. Frakcionacija se provodi u protusmjernoj shemi u kojoj se raspodjela između svježih obroka obiju faza događa u nizu zasebnih stupnjeva. Odvajanje komponenti je glavna prednost ove metode [11, 24].

Efikasnost ekstrakcije je veća, ako se odvija s više manjih obroka otapala koje se koristi za ekstrakciju određenog uzorka.

Idealan postupak ekstrakcije karakterizira jednostavnost, brzina, prihvatljiva cijena, kvantitativni analitički rezultat bez gubitka ili razgradnje analita te otopina analita iz koje se izravno može mjeriti koncentracija [25].

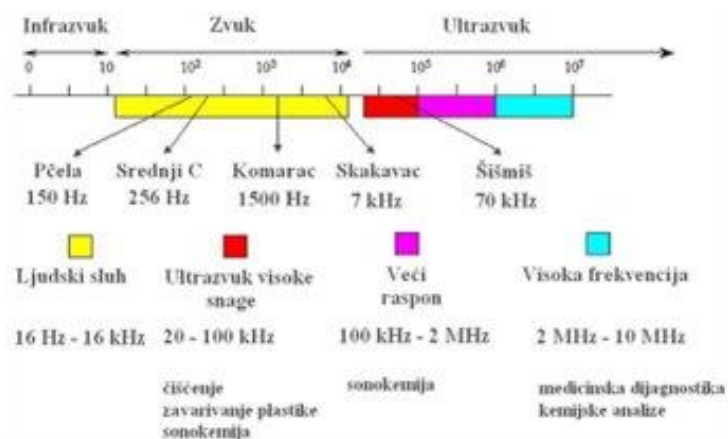
#### 2.6.1. Disperzivno tekućinsko-tekućinska mikroekstrakcija

Postupkom ekstrakcije se ne može direktno odrediti vitamin E. Vitamin E je potrebno izdvojiti iz smjese odnosno iz uzoraka, te se potom određuje ostalim metodama.

Disperzivna tekućinsko-tekućinska mikroekstrakcija (engl. *Dispersive liquid – liquid microextraction*, DLLME) je novija metoda koja omogućuje određivanje vitamina E, odnosno  $\alpha$ -tokoferola. Postupak DLLME se temelji na disperziji (raspršenju) čestica otapala u vodenoj fazi. Kapljice otapala koje nastaju dolaze u kontakt s uzorkom. Nakon toga slijedi ekstrakcija te se na taj način željena tvar određuje [26].

## 2.6.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Prilikom definiranja riječi zvuk, može se reći da je to mehanički val, čije frekvencije iznose od 16 Hz do 20 kHz. Ovaj raspon obuhvaća frekvencije koje čuje ljudsko uho. Zvuk čije su frekvencije niže od 16 Hz pripada području infrazvuka, dok zvuk čije su frekvencije više od 20 kHz pripada području ultrazvuka (Slika 6) [27].



Slika 6: Podjela zvuka prema frekvenciji [28].

Da bi zvuk nastao, potrebno je periodično titranje izvora zvuka, prilikom čega dolazi do promijene tlaka medija u neposrednoj okolini. Poremećaj tlaka koji nastaje, prenosi se na susjedne čestice medija i tako se zvuk širi, ovisno o mediju u kojem nastaje, u obliku longitudinalnih ili transverzalnih valova [27].

Kao što je prikazano na slici 6, ultrazvuk je zvučni val, čije su frekvencije više od praga osjetljivosti ljudskog sluha. Frekvencije više od 20 000 Hz do 10<sup>7</sup> Hz [29].

Na slici 6 vidljivo je da ultrazvuku visoke frekvencije (MHz) pripada dijagnostički ultrazvuk koji ne uzrokuje fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koje prolazi, a česta primjena mu je u analitičkoj kemiji za određivanje sastava, strukture, viskoznosti hrane i sl. Ultrazvučni val visokog intenziteta (1-1000 W/cm<sup>2</sup>) i frekvencijama 20-100 kHz uzrokuje fizička oštećenja tkiva, kao i određene kemijske reakcije, a može se stvoriti pokretanjem tekućine, mlazom plina te pomoću električne snage [30].

Za generiranje ultrazvuka potrebne su vibracije veće energije jer su mu i frekvencije veće. Da bi jedan oblik energije pretvorili u drugi koriste se uređaji koji se nazivaju pretvornici. Za dobivanje ultrazvuka, koriste se ultrazvučni pretvornici. Ultrazvučni pretvornici

pretvaraju neki oblik energije u vibriranje visoke energije, odnosno, ultrazvuk [31]. Tri su vrste pretvornika:

- Plinski pretvornik, ujedno i najjednostavniji pretvornik, princip rada se temelji na zvižduku, odnosno, zrak se upuhuje u cijev koja sadrži rezonantnu šupljinu i pomoćni klip, a kroz otvor izlazi ultrazvuk.
- Tekućinski pretvornik radi na principu, da otopinu u kojoj se generira ultrazvuk, pod tlakom se upumpava u otvor sa šupljinom za miješanje. Kako otopina prolazi, nailazi na čelične oštrice koje zbog gibanja otopine proizvode vibracije, odnosno ultrazvuk.
- Elektromehanički pretvornik, koji se i najviše koristi, dijeli se na dvije vrste: piezoelektrični pretvornici i magnetostrukturalni pretvornici [32].

Sama primjena ultrazvuka je široka, npr. u medicinskoj dijagnostici, navigacija, uništavanje bakterija, ispitivanje homogenosti materijala, mjerenje dubine mora, bušenje, itd.

Ultrazvučna ekstrakcija predstavlja jednostavan postupak koji koristi zvučne valove da bi se ekstrahirao uzorak koji je uronjen u organsko otapalo. Ono što ovu vrstu ekstrakcije čini boljom je bolji kontakt između čvrste tvari i otapala, na način da ultrazvuk visoke snage, djelovanjem kavitacija na stanični materijal, tj. stanične stijenke, omogućuje veće prodiranje otapala u uzorak čime se povećava prijenos mase. Kako se stanične stijenke razaraju dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem stanice. Na ovaj način se ubrzava ekstrakcija te se ujedno povećava njena efikasnost [25, 30]. Pri nižim frekvencijama, kao što je raspon od 18 kHz do 40 kHz, učinak ultrazvuka je korisniji, dok je zanemariv pri rasponu od 400 kHz do 800 kHz, a razlog tomu je što pri tim frekvencijama prevladavaju mehanički učinci kavitacije kao što je turbulencija ili strujanje tekućine [30].

Prilikom prolaska kroz medij, ultrazvuk može uzrokovati:

- Kavitaciju,
- Zagrijavanje,
- Kompresiju i širenje,
- Turbulenciju,
- Razne strukturne učinke, itd.

Kavitacija je nastajanje mjehurića koji su ispunjeni parama unutar tekućine u strujanju, a njihovo iščezavanje je praćeno nastajanjem nepoželjnih udarnih valova. Pojava kavitacije ovisi o nekoliko čimbenika:



- Frekvencija ultrazvuka,
- Intenzitet ultrazvuka,
- Svojstva analita (npr. viskoznost, gustoća, površinska napetost, prisutnost otopljenih plinova) [30].

Dva su načina primjene ultrazvuka u analitičkoj kemiji:

- Izravno na uzorak,
- Neizravno kroz stijenke posude uzorka pomoću vodene kupelji.

U kemijskim laboratorijima najčešće se nalazi ultrazvučna kupelj. Ultrazvučna kupelj emitira zvučne valove visoke frekvencije, kao i energija, u posudi koja je ispunjena fluidom (voda). Ovakav izvor ultrazvučnog zračenja nije moćan, snaga zračenja iznosi od 1 W/cm<sup>2</sup> do 5 W/cm<sup>2</sup>, a mogu raditi sa samo jednom frekvencijom (40 kHz) ili ima jedinicu s različitim frekvencijama koje rade istovremeno te može imati regulator temperature. Veća snaga ultrazvuka, i do 100 puta, može se dobiti pomoću ultrazvučnih sondi, koje su izravno uronjene otopinu. Osim toga, sonda može biti moćna za ekstrakciju analita iz čvrstih uzoraka otapalom, ali isto tako može pokazati negativan utjecaj [33].

Glavne prednosti ultrazvučne ekstrakcije:

- Skraćeno vrijeme ekstrakcije,
- Veće iskorištenje,
- Veća kvaliteta ekstrakta.

## 2.7. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ima široku primjenu. Iako nema radova na temu ekstrakcije vitamina E potpomognute ultrazvukom iz žumanjka jajeta, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom iz žumanjka jajeta, najčešće se koristila za ekstrakciju luteina, odnosno karotenoida i nekih bioaktivnih tvari. Li i sur. (2017) [34] su napravili ekstrakciju kolesterola iz inkluzijskog kompleksa kolesterola-β-ciklodekstrina pripremljenog od ulja patkinog žumanjka koja se provodila ekstrakcijom refluksa, ekstrakcijom Soxhlet i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Za analizu su im bila potrebna pačja jaja, metanol, silikagel. Prije ekstrakcije su pripremili inkluzijski kompleks kolesterola-β-ciklodekstrina, koji su potom podvrgnuli ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom, refluks

ekstrakciji te Soxhlet ekstrakciji. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je bila indirektna toplinski kontrolirana ekstrakcija, pri čemu se temperatura kontrolirala vanjskom cirkulirajućom vodom. Uzorak za ekstrakciju pripremljen je miješanjem 5 g uzorka s odgovarajućim volumenom etanola u tikvici s okruglim dnom, pri čemu je pH smjese podešen na 7 pomoću KOH. Eksperimentalni uvjeti su bili: ultrazvučna snaga 150 – 250 W, temperatura ekstrakcije 50 – 70 °C te vrijeme sonikacije 25 – 45 min. Za refluks ekstrakciju bilo je potrebno u tikvicu od 250 mL odvagati 5,0 g uzorka i dodati 50 mL etanola, smjese je podešen pH 7,0 otopinom KOH. Tikvica je zatim spojena sa hladilom i stavljena u vodenu kupelj temperature 65 °C, ekstrakcija se provodila 120 minuta. Kod Soxhlet ekstrakcije 5,0 g uzorka stavljeno je unutar celuloznog tuljka, uzorak je ekstrahiran sa 150 mL etanola tokom 240 minuta na temperaturi od 85 °C. Za mjerenje sadržaja kolesterola u kolesterol-β-ciklodekstrin kompleksu korištena je modificirana  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$  kromogenska metoda. Također, ispitivali su utjecaj omjera otapala i krute tvari, utjecaj ultrazvučne snage, utjecaj temperature, te utjecaj vremena ultrazvuka. Rezultati pokazuju kako je ekstrakcija kolesterola potpomognuta ultrazvukom iz inkluzijskog kompleksa kolesterol-β-ciklodekstrin povoljnija u povećanju prinosa kolesterola, skraćivanju vremena ekstrakcije i potrošnje otapala u usporedbi s refluksnom ekstrakcijom i ekstrakcijom Soxhlet. Osim toga, analiza pokazuje optimalne uvjete ekstrakcije: omjer otapala i krutine, ultrazvučna snaga, temperatura ekstrakcije i vrijeme: 10 mL/g, 251 W, 56 °C i 36 minuta. Svi ti čimbenici pokazali su značajan utjecaj na prinos kolesterola. U tim optimiziranim uvjetima eksperimentalni prinos kolesterola iznosio je  $98,12 \pm 0,25 \%$ , što je bilo blizu očekivane vrijednosti iskorištenja 98,03 %.

Xie i sur. (2020) [35] proveli su usporedbu izopropanol-vrtložne metode i optimizirane izopropanol ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (IPA-USA) u ekstrakciji lipida. Potrebne su im bile razne kemikalije, kloroform, metil-*tert*-butil-eter, acetonitril, izopropil alkohol, metanol, amonijev acetat, ultračista voda, standardi lipida, kao i različita kokošja jaja. Provodili su ekstrakciju dvofaznog i jednofaznog otapala. Ekstrakcija dvofaznog otapala provodila se MTBE (metil-*tert*-butil-eter) metodom i metodom mape, dok se ekstrakcija jednofaznog otapala provodila MMC (metilmetankatinon) metodom i IPA (isopropanol) metodom. Ekstrakcija lipida provodila se potapanjem smjese u ultrazvučnu vodenu kupelj s frekvencijom ultrazvuka 40 kHz. Ispitivan je utjecaj snage ultrazvuka, omjer tekućine i krutine te vrijeme ekstrakcije. Eksperimentalna domena svakog parametra potvrđena je prema preliminarnim pokusima i radnim granicama. Vrijeme ekstrakcije bilo je u rasponu od 5 do 60 minuta, snaga ultrazvuka 120 – 400 W. Temperatura ekstrakcijskog sustava kontrolirana je na  $23 \pm 2$  °C. Kako je masa žumanjka uvijek bila 10 mg, volumen

otapala za ekstrakciju prema omjeru uzorka proučavan je od 1 : 10 do 6 : 10. Nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrakt je centrifugiran pri 5000 g tijekom 10 minuta na 4 °C. Supernatant je prikupljen i razrijeđen na 1 mg/mL, te je pohranjen na -20 °C do MS analize. Nakon ekstrakcije, uzorci su podvrgnuti MS analizi, gdje se IPA metoda pokazala kao najbolja sa najviše identificiranih lipida. Korištenjem IPA–USAE metode za profil lipida u žumanjku jajeta, identificirano je ukupno 3364 značajke u načinu pozitivne ionizacije i 2756 značajki u načinu negativne ionizacije MS analize, koje su bile značajno veće od vrijednosti metoda ekstrakcije IPA – vrtložnog vrtloga (3219 značajki u pozitivnom načinu rada, 2608 značajki u negativnom načinu rada). Nadalje, za novu metodu ekstrakcije, ukupni broj identificiranih lipida (282 lipida u pozitivnom načinu rada i 231 lipida u negativnom načinu rada) bio je veći od onog koji je identificiran u IPA-vrtložnoj metodi (269 lipida u pozitivnom načinu rada i 214 lipida u negativnom načinu rada). Iskorištenje IPA–USAE metodom je bilo veće u odnosu na IPA–vrtložnu. IPA–USAE metoda pokazuje bolje performanse u vremenu ekstrakcije, gubitku lipida, iskorištenju i broju identificiranih lipida.

Yue i sur. (2006) [36] napravili su ekstrakciju luteina iz žumanjka jajeta pomoću metode ekstrakcije otapalom i ekstrakcije otapalom potpomognute ultrazvukom. Kao otapalo je korišten heksan. Iskorištenje metode ekstrakcije otapalom potpomognute ultrazvukom bilo je veće. Također, rezultati su pokazali da je lužina utjecala na stabilnost luteina u žumanjku. Da bi proveli ovo istraživanje, za rad su im bili potrebni metanol, heksan, aceton, lutein, askorbinska kiselina te kokošja jaja koja su čuvana na 4 °C prije analize. Žumanjci su pomiješani s askorbinskom kiselinom, nakon čega se provodila saponifikacija uzorka s četiri različita volumena 10 % NaOH u vodi. Zatim je dodana destilirana voda u odgovarajuće epruvete s različitim volumenima lužine. Uzorci koji se nalaze u epruvetama miješani su 30 s, a potom inkubirani na 60 °C tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, svakom uzorku dodan je heksan, te se provelo miješanje. Centrifugiranjem tijekom 20 minuta na 1000 g došlo je do razdvajanja slojeva, gdje je odvojeni sloj heksana prenesen u čistu epruvetu, a svaki je uzorak potom ponovno ekstrahiran s heksanom. Prikupljeni slojevi heksana su pomiješani te je heksan uparen na 30 °C u vakuumu. Nakon uparavanja dodan je metanol za otapanje ekstrakta. Tijekom prve ekstrakcije heksanom, u otopinu uzorka uronjena je ultrazvučna sonda. Otopina uzorka sonificirana je pri 10 W tijekom 10 minuta, a potom centrifugirana pri 1000 g 20 minuta. Sloj heksana je uklonjen, a preostali uzorak ekstrahiran heksanom bez ultrazvuka. Ekstrahirani slojevi heksana su spojeni, upareni te su ekstrakti otopljeni u metanolu. Lutein iz ekstrahiranog žumanjka analiziran je pomoću HPLC. Koncentracija luteina je izračunata pomoću kalibracijske krivulje pripremljene sa standardom čistog luteina.

Na prinos ekstrakcije značajno je utjecala razina saponifikacije za metode ekstrakcije otapalom i ekstrakcije otapalom potpomognute ultrazvukom. Prinos ekstrakcije otapalom potpomognute ultrazvukom bio je veći za oko 30 µg/g od najvećeg prinosa metode ekstrakcije otapalom.

Jiang i sur. (2019) [37] opisuju postupak i uvjete ekstrakcije fosvitina u žumanjku kokošnjih jaja, pri čemu se ekstrakcija provodila ultrazvučno termalno potpomognutom ekstrakcijom koja se provodila s ultrazvučnim homogenizator. Za istraživanje su bila potrebna jaja, standard fosvitina, natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid – gel. Prije analize, određeni su parametri izolacije fosvitina, čistoće, te aktivnosti. Analiza uzoraka provodila se SDS–PAGE elektroforezom, masenom spektrometrijom nano LC–MS/MS, FTIR-om. Također su ispitali sposobnost vezanja fosvitina za željezo, te su odredili hidrofobnost površine. Rezultati visoke čistoće fosvitina ( $80 \pm 2$  %) pokazuju kako je ultrazvučna termalno potpomognuta ekstrakcija učinkovitija metoda ekstrakcije. Rezultati masene spektrometrije nano LC–MS/MS pokazali su da su identificirani proteini uglavnom VIT2 i VIT1, a relativna brojnost bila je 52,9 % odnosno 37,6 %. Rezultati FTIR analize su pokazali da ultrazvučna termalno potpomognuta ekstrakcija nije promijenila sekundarnu strukturu fosvitina.

Tsiaka i sur. (2018) [38] naveli su kako je žumanjak idealna prehrambena matrica. Određivali su sadržaj karotenoida (luteina i zeaksantina), a ekstrakcije koje su se provodile bile su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i mikrovalna ekstrakcija. Za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom i mikrovalnu ekstrakciju odvagana je odgovarajuća masa sušenog žumanjka, prah je suspendiran u nekoliko različitih otapala za ekstrakciju. Za klasičnu ekstrakciju postupak je proveden s omjerom otapala i krute tvari 12 : 1 ovisno o modificiranoj Folchovoj metodi u 3 koraka. Ogovarajuća masa osušenog žumanjka u prahu homogenizira se otopinom kloroform – metanol te se dobro promiješa. Smjesa je ostavljena da se uravnoteži 10 minuta, a supernatant je sakupljen nakon centrifugiranja pri 3000 g tijekom 5 minuta. Ostatak je ponovno dva puta ekstrahiran Folchovom mješavinom otapala. Izlučeni ekstrakti su sakupljeni i dodana je voda kako bi nastao dvofazni sustav otapala, koji je ostavljen da se uravnoteži preko noći pri sobnoj temperaturi. Kloroformna faza je obnovljena, dok je polarna vodeno – metanolna faza odbačena. Nakon svakog procesa ekstrakcije, čvrsti materijal se odvojio od supernatanta vakuumskim filtriranjem i ekstrakt je uparen radi uklanjanja otapala pomoću rotacijskog uparivača na 50 °C. Zatim se lipidna frakcija ekstrakta razrijedila ekstrakcijskim otapalom i alikvotom karotenoidnog ostatka sve dok se 100 mg ekstrakta karotenoida nije ispralo strujom dušika. Zatim se suhi ostatak otopio u acetonu i ukupni sadržaj karotenoida je procijenjen spektrofotometrijskim mjerenjem. LC–

MS/MS rezultati ukazali su na prednost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u ekstrakciji luteina i zeaksantina, gdje su veći prinosi postignuti s 1 : 1 n – heksan – acetonom kao smjesom otapala na 19 minuta, 600 W i 35 mL/g. Rezultati su pokazali kako je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom učinkovitija u odnosu na mikrovalnu ekstrakciju.

Osim navedenih primjera, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može se koristiti za ekstrakciju raznolikih spojeva. Tako su Xiao i sur. (2018) [39] iz sjemenki *Ziziphus jujuba* Mill. var. *Spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou uz pomoć ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, ekstrahirali ulje iz kojeg je određivan sadržaj vitamin E. U ovom istraživanju, uljna frakcija sjemenki *Zizyphi Spinosa* ekstrahirana je ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Za istraživanje su bile potrebne sjemenke *Zizyphi Spinosa*, vitamin E, skvalen te standardi masnih kiselina, metanol, acetonitril, i deionizirana voda. Konvencionalna toplinska ekstrakcije obuhvaća usitnjavanje sjemenki *Zizyphi Spinosa*, čiji je prah refluksiran u 75 mL petroletera na 80 °C tijekom 3 h. Ekstrahirane otopine su sakupljene i koncentrirane pomoću rotacijskog uparivača na 50 °C, kako bi se dobio ekstrakt ulja. Parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, omjer tekućine i krute tvari te ultrazvučna snaga. Učinkovitost ekstrakcije procijenjena je na temelju prinosa vitamina E i skvalena. Vitamin E, skvalen i masne kiseline u sjemenkama *Zizyphi Spinosa* određeni su pomoću HPLC. Optimizirani postupak u ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom rezultirao je prinosom vitamina E od  $29,58 \pm 0,19$  mg/100 g sjemenki *Zizyphi Spinosa* i prinosom skvalena od  $820,49 \pm 3,66$  µg/100 g sjemenki *Zizyphi Spinosa*, koji su bili mnogo veći od onih dobivenih konvencionalnom toplinskom ekstrakcijom (tj. prinos vitamina E od 18,67 mg/100 g sjemenki *Zizyphi Spinosa* te prinos skvalena od 627,25 µg/100 g sjemenki *Zizyphi Spinosa*). Utvrđeno je da ulje sjemenki *Zizyphi Spinosa* sadržava oleinsku kiselinu i linolnu kiselinu. Osim toga, ulje sjemenki *Zizyphi Spinosa* dobiveno ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pokazalo je jače aktivnosti uklanjanja superoksidnih aniona i hidroksilnih radikala, u usporedbi s uljem sjemenki *Zizyphi Spinosa* ekstrahiranim konvencionalnom toplinskom ekstrakcijom.

Šalmaši (2009) [40] je koristio ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom kako bi ekstrahirao ulje iz sjemenki čaja. Konvencionalna metoda ekstrakcije provodila se u tikvici od 250 mL napunjenoj s 25 g samljevenog uzorka u 200 mL n–heksana. Ekstrakcija je izvedena na 45 °C, 250 o / min kroz 2 sata. Nakon svake ekstrakcije, ekstrakti su filtrirani pod vakuumom, a zatim su ekstrakti sakupljeni i koncentrirani pomoću rotacijskog uparivača kako bi se dobilo ulje sjemenki čaja, kojem je zatim pod vakuumom uklonjen zaostali n–heksan.

Parametri kao što su ultrazvučna snaga, vrijeme ekstrakcije, temperatura ekstrakcije i omjer otapala prema krutoj tvari ispitani su na prinos ulja sjemenki čaja uz pomoć ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Najbolji uvjeti za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom su ultrazvučna snaga 50 W, temperatura ekstrakcije 30 °C, vrijeme ekstrakcije 30 minuta te omjer otapala prema krutoj tvari 6 : 1. Dobiveni rezultati uspoređeni su s konvencionalnim metodama. Opaženo je da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom zahtijeva kraće vrijeme ekstrakcije i smanjenu potrošnju otapala. Prinos ulja sjemenki čaja povećavao se s povećanjem ultrazvučne snage, dok se smanjivao s porastom temperature. Sastavi masnih kiselina ulja ekstrahiranih metodom uz pomoć ultrazvuka i konvencionalnom metodom analizirani su pomoću plinske kromatografije. Rezultati nisu pokazali značajan utjecaj na sastav ulja sjemenki čaja primjenom ultrazvuka.

Iz navedenih primjera može se zaključiti kako ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ima široku primjenu, a razlog tomu leži u tome što ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom poboljšava učinkovitost ekstrakcije, na način da olakšava prodiranje otapala u biljni materijal te dopušta oslobodjenje unutarstaničnih tvari.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

Kemikalije potrebne za pripremu uzoraka za analizu:

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

Kemikalije potrebne za određivanje koncentracije vitamina E pomoću HPLC:

- metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- isopropanol, HPLC čistoće (Fisher Chemical, UK),

#### 3.2. Pribor i instrumentacija

Pribor i instrumentacija potrebni za pripremu uzoraka za analizu:

- kivete za centrifugu (50 mL)
- vaga
- centrifuga
- pipeta, graduirana (20 mL)
- mikropipeta
- sustav za direktnu ultrazvučnu ekstrakciju
- HPLC vialice (1,5 mL)

Instrumentacija za HPLC analizu:

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

### 3.3. Odabir uzoraka za analizu

Uzorci za analizu odabrani su prema načinu ishrane nesilica i pretpostavki o koncentraciji vitamina E. Uzorci jaja koja su analizirana su jaja prikupljena na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva (Slika 7 i Slika 8), jaja dostupna u trgovačkim lancima te jaja nesilica koje su se hranile krmnom smjesom obogaćenom vitaminom E.



Slika 7: Uzorci jaja s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva 1.

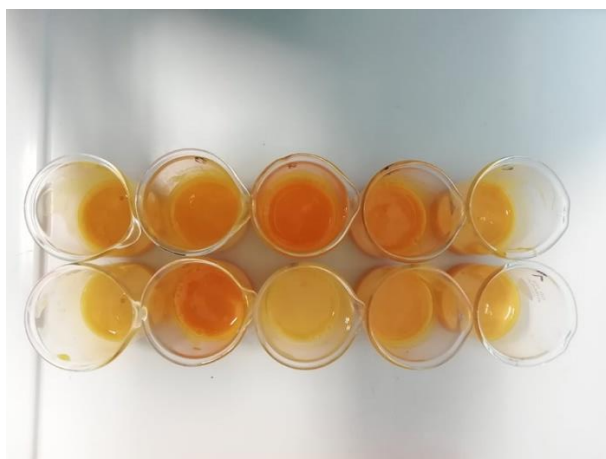


Slika 8: Uzorci jaja s obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva 2.



### 3.4. Priprema uzoraka za analizu

Odabrani uzorci jaja pripremljeni su za analizu tako da je najprije odijeljen žumanjak od bjelanjka, zaostali bjelanjak uklonjen je pomoću papirnatoг ručnika i žumanjak je prenesen u čistu i suhu staklenu čašu (Slika 9). Uzorak žumanjka je potom homogeniziran pomoću homogenizatora. Na analitičkoj vagi odvagano je 2,500 g pripremljenog uzorka žumanjka, dodan je 1 mL 0,2 % otopine BHT u metanolu i 6,5 mL metanola. Tako pripremljen uzorak je dobro izmiješan pomoću laboratorijske treskalice i potom ostavljen 3 sata u mraku do analize. Kod uzoraka kod kojih se koristila ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, uzorak pripremljen na ranije opisan način podvrgnut je djelovanju ultrazvuka tijekom 2 minute i ostavljen u mraku do analize. Nakon stajanja 3 sata u mraku a prije uzimanja uzoraka za analizu, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 10 000 g. Za analizu je uziman supernatant koji je prenesen u HPLC tamne vijalice (Slika 10).



Slika 9: Razdvojen i homogeniziran uzorak žumanjka pripremljen za vaganje.



Slika 10: Supernatant uzorka u HPLC tamnim vijalicama.

Parametri za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom:

Uređaj: Sonoplus 3100 (Bandelin)

Sonda: MS 73 mikrotip

Amplituda: 70 %

Interval ultrazvuka: 2 s

Interval pauze: 1 s

Ukupno vrijeme: 2 min.

### 3.4.1. Odabir parametara ekstrakcije

#### 3.4.1.1. Odabir postupka ekstrakcije

Kod odabira postupka ekstrakcije, uspoređena su dva postupka: klasična ekstrakcija tekuće–čvrsto i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UVZS). Uzorci za odabir postupka ekstrakcije, ali i svi dalje pripremani uzorci, pripremljeni su na način opisan u dijelu 4.4. *Priprema uzoraka za analizu.* Za analizu su uzeti uzorci iz više žumanjka koji su potom homogenizirani.

#### 3.4.1.2. Odabir vremena ekstrakcije

Kako je u ranijim istraživanjima uočeno da se vrijeme ekstrakcije može smanjiti sa 16 sati kako je opisano u radu [42] na 3 sata, potrebno je provjeriti, može li se dodatno smanjiti vrijeme ekstrakcije ako se koristi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Analizirana su 4 uzorka koja su uzeta iz istog žumanjka. Uzorci za analizu su uzimani nakon 1, 2, 3 i 4 sata.

#### 3.4.1.3. Utjecaj temperature na rezultate analize

Kako bi se odredio utjecaj temperature na rezultate analize, uspoređene su dobivene koncentracije vitamina E iz 10 istih uzoraka. Mjerenja su izvođena pri sobnoj temperaturi i potom pri 40 °C.

#### 3.4.1.4. Utjecaj vremena ekstrakcije i temperature

Nakon ispitivanja utjecaja vremena ekstrakcije i temperature, ova dva parametra su zajedno ispitana na 5 istih uzoraka. Temperatura pri svim analizama je bila 40 °C, dok su uzorci za analizu uzimani odmah nakon centrifugiranja (bez stajanja) te nakon 1, 2, 3 i 4 sata.

#### 3.4.1.5. Utjecaj amplitude UZV

Uspoređene su i amplitude pri ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom (50 %, 70 % i 90 %). Usporedba je rađena na 5 uzoraka pri svakoj amplitudi. Za sve tri skupine uzorci su uzeti iz iste smjese žumanjaka.

### 3.5. Analiza

Određivanje koncentracije vitamina E u uzorcima provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Uvjeti analize:

- Mobilna faza: isopropanol : metanol = 45 : 55
- Protok: 0,7 mL/min
- Temperatura: sobna temperatura
- Vrijeme analize: 10 min
- Detektor: UV-VIS, valna duljina: 295 nm

- Injektiran volumen: 20  $\mu$ L
- Kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), Shimadzu
- Vrijeme zadržavanja: 4,7 minuta

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Odabir postupka ekstrakcije

Rezultati dobiveni za ekstrakciju tekuće–čvrsto (klasična) kao i za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UVZS) prikazani su u tablici 1 i 2. Iz rezultata je vidljivo je veća koncentracija vitamina E izmjerena u uzorcima koji su podvrgnuti UVZS ekstrakciji i to za 4 % kod prve skupine uzoraka, odnosno 3 % kod druge skupine uzoraka. Za daljnje pripreme uzoraka odabrana je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

Tablica 1: Rezultati analize za odabir postupka ekstrakcije za prvu skupinu uzoraka

| uzorak | ekstrakcija | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjaka |
|--------|-------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1      | Klasična    | 13,773          | 4,136             | <b>4,153</b>                          |
| 2      |             | 13,819          | 4,150             |                                       |
| 3      |             | 13,895          | 4,173             |                                       |
| 1      | UVZS        | 14,268          | 4,285             | <b>4,317</b>                          |
| 2      |             | 14,103          | 4,235             |                                       |
| 3      |             | 14,758          | 4,432             |                                       |

Tablica 2: Rezultati analize za odabir postupka ekstrakcije za drugu skupinu uzoraka

| uzorak | ekstrakcija | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjaka |
|--------|-------------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1      | klasična    | 3,954           | 1,187             | <b>1,175</b>                          |
| 2      |             | 3,864           | 1,160             |                                       |
| 3      |             | 3,919           | 1,177             |                                       |
| 1      | UVZS        | 4,074           | 1,223             | <b>1,207</b>                          |
| 2      |             | 3,962           | 1,190             |                                       |
| 3      |             | 5,999           | 1,802             |                                       |

#### 4.2. Odabir vremena ekstrakcije

U tablici 3 prikazani su rezultati dobiveni određivanjem koncentracije vitamina E nakon 1, 2, 3 i 4 sata ekstrakcije. Vidljivo je da je najviša koncentracija vitamina E izmjerena u uzorcima nakon 1 sata ekstrakcije. Nakon 2 sata koncentracija vitamina E smanjila se za 1,6 % dok se nakon 3 i 4 sata koncentracija smanjila za isti postotak 3,6 %. Za nastavak rada odabrano je vrijeme ekstrakcije 1 sat.

Tablica 3: Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju vitamina E

| vrijeme ekstrakcije | uzorak | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjka |
|---------------------|--------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| 1 sat               | 1      | 7,915           | 2,377             | 2,401                                |
|                     | 2      | 7,906           | 2,374             |                                      |
|                     | 3      | 8,155           | 2,449             |                                      |
|                     | 4      | 8,002           | 2,403             |                                      |
| 2 sata              | 1      | 7,700           | 2,312             | 2,362                                |
|                     | 2      | 7,884           | 2,368             |                                      |
|                     | 3      | 7,968           | 2,393             |                                      |
|                     | 4      | 7,908           | 2,375             |                                      |
| 3 sata              | 1      | 7,833           | 2,352             | 2,314                                |
|                     | 2      | 7,610           | 2,285             |                                      |
|                     | 3      | 7,723           | 2,319             |                                      |
|                     | 4      | 7,659           | 2,300             |                                      |
| 4 sata              | 1      | 7,728           | 2,321             | 2,315                                |
|                     | 2      | 7,631           | 2,292             |                                      |
|                     | 3      | 7,733           | 2,322             |                                      |
|                     | 4      | 7,744           | 2,326             |                                      |

#### 4.3. Utjecaj temperature na rezultate analize

Iz rezultata prikazanih u tablici 4 može se zaključiti da se veća koncentracija vitamina E u uzorcima dobije mjerenjem pri temperaturi 40 °C. Uočeno je i da je pri povišenoj temperaturi tlak u HPLC sustavu stabilniji, pa je za daljnja mjerenja odabrana temperatura 40 °C.

Tablica 4: Prikaz rezultata utjecaja temperature na koncentraciju vitamina E

| vrijeme ekstrakcije | temperatura | uzorak | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjka |
|---------------------|-------------|--------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| 1 sat               | sobna temp. | 1      | 6,155           | 1,848             | <b>1,788</b>                         |
|                     |             | 2      | 6,775           | 2,035             |                                      |
|                     |             | 3      | 5,956           | 1,789             |                                      |
|                     |             | 4      | 6,032           | 1,811             |                                      |
|                     |             | 5      | 5,793           | 1,740             |                                      |
|                     |             | 6      | 5,919           | 1,777             |                                      |
|                     |             | 7      | 5,586           | 1,677             |                                      |
|                     |             | 8      | 5,86            | 1,760             |                                      |
|                     |             | 9      | 5,368           | 1,612             |                                      |
|                     |             | 10     | 6,096           | 1,831             |                                      |
| 1 sat               | 40 °C       | 1      | 8,924           | 2,680             | <b>1,971</b>                         |
|                     |             | 2      | 6,882           | 2,067             |                                      |
|                     |             | 3      | 5,925           | 1,779             |                                      |
|                     |             | 4      | 6,186           | 1,858             |                                      |
|                     |             | 5      | 5,836           | 1,753             |                                      |
|                     |             | 6      | 6,028           | 1,810             |                                      |
|                     |             | 7      | 8,220           | 2,468             |                                      |
|                     |             | 8      | 5,995           | 1,800             |                                      |
|                     |             | 9      | 5,374           | 1,614             |                                      |
|                     |             | 10     | 6,256           | 1,879             |                                      |

#### 4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije i temperature

U tablici 5 prikazani su rezultati dobiveni određivanjem koncentracije vitamina E pri temperaturi 40 °C i različitim vremenima ekstrakcije. U tablici su plavom bojom označene vrijednosti koje nisu uzete u obzir jer su puno više od prosječnih vrijednosti unutar skupine. Najveća koncentracija izmjerena je nakon 1 sata ekstrakcije, tako da se za daljnju pripremu uzoraka kao vrijeme ekstrakcije koristiti 1 sat.

Tablica 5: Koncentracije vitamina E izmjerene pri 40 °C uz različito vrijeme ekstrakcije

| vrijeme ekstrakcije | uzorak | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjka |
|---------------------|--------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| bez stajanja        | 1      | 5,155           | 1,548             | <b>1,584</b>                         |
|                     | 2      | 11,182          | 3,358             |                                      |
|                     | 3      | 5,230           | 1,571             |                                      |
|                     | 4      | 5,483           | 1,647             |                                      |
|                     | 5      | 5,235           | 1,572             |                                      |
| 1 sat               | 1      | 6,298           | 1,891             | <b>1,893</b>                         |
|                     | 2      | 6,286           | 1,888             |                                      |
|                     | 3      | 6,466           | 1,942             |                                      |
|                     | 4      | 6,168           | 1,852             |                                      |
|                     | 5      | 12,176          | 3,656             |                                      |
| 2 sata              | 1      | 6,486           | 1,948             | <b>1,732</b>                         |
|                     | 2      | 5,674           | 1,704             |                                      |
|                     | 3      | 6,083           | 1,827             |                                      |
|                     | 4      | 5,431           | 1,631             |                                      |
|                     | 5      | 5,164           | 1,551             |                                      |
| 3 sata              | 1      | 4,917           | 1,477             | <b>1,520</b>                         |
|                     | 2      | 5,190           | 1,559             |                                      |
|                     | 3      | 4,995           | 1,500             |                                      |
|                     | 4      | 5,887           | 1,768             |                                      |
|                     | 5      | 4,321           | 1,298             |                                      |
| 4 sata              | 1      | 5,452           | 1,637             | <b>1,689</b>                         |
|                     | 2      | 6,068           | 1,822             |                                      |
|                     | 3      | 5,823           | 1,749             |                                      |
|                     | 4      | 5,309           | 1,594             |                                      |
|                     | 5      | 5,466           | 1,641             |                                      |

#### 4.5. Utjecaj amplitude UZV

Iz podataka u tablici 6 vidljivo je da promjena amplitude vala nema utjecaja na ekstrakciju vitamina E iz uzoraka žumanjaka. U daljnjem radu za ekstrakciju će se koristiti amplituda 70 %.



Tablica 6: Koncentracija vitamina E dobivena uz različite amplitude UZV

| % amplitude   | uzorak | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka | srednja vrijednost mg/100 g žumanjka |
|---------------|--------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|
| 50% amplitude | 1      | 3,402           | 1,022             | <b>1,051</b>                         |
|               | 2      | 3,557           | 1,068             |                                      |
|               | 3      | 3,608           | 1,083             |                                      |
|               | 4      | 3,516           | 1,056             |                                      |
|               | 5      | 3,409           | 1,024             |                                      |
| 70% amplitude | 1      | 3,493           | 1,049             | <b>1,050</b>                         |
|               | 2      | 3,549           | 1,066             |                                      |
|               | 3      | 3,362           | 1,010             |                                      |
|               | 4      | 3,436           | 1,032             |                                      |
|               | 5      | 3,646           | 1,095             |                                      |
| 90% amplitude | 1      | 3,510           | 1,054             | <b>1,055</b>                         |
|               | 2      | 3,586           | 1,077             |                                      |
|               | 3      | 3,428           | 1,029             |                                      |
|               | 4      | 3,483           | 1,046             |                                      |
|               | 5      | 3,566           | 1,071             |                                      |

#### 4.6. Parametri ekstrakcije i analize tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

S obzirom na dobivene rezultate za ekstrakciju vitamina E iz žumanjaka jaja koristit će se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, dok će se HPLC analiza provoditi pod povišenom temperaturom (40 °C). Kalibracija je napravljena ranije. Dobiveni  $R^2$  iznosio je 0,9994 što ukazuje na dobro slaganje izmjerenih vrijednosti pripremljenih standardnih otopina vitamina E i regresijskog pravca.

Parametri za ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom:

Amplituda: 70 %

Interval ultrazvuka: 2 s

Interval pauze: 1 s

Ukupno vrijeme: 2 min.

Odabrani parametri HPLC analize:

Mobilna faza: isopropanol : metanol = 45 : 55

Protok: 0,7 mL/min

Temperatura: 40 °C

Vrijeme analize: 10 min

Detektor: UV-VIS, valna duljina: 295 nm

Injektiran volumen: 20 µL

Kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), Shimadzu

Vrijeme zadržavanja: 4,7 minuta

#### 4.7. Analiza realnih uzoraka

Analizirani su uzorci iz različitih trgovačkih lanaca prisutnih na tržištu (trgovački lanci bit će označeni kao trgovački lanac 1, 2 i 3). Rezultati dobiveni analizom 3 skupine jaja prikazani su u tablicama 7, 8 i 9.

Tablica 7: Koncentracija vitamina E u jajima kupljenima u trgovačkom lancu 1

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 5,815           | 1,746             |
| 2                               | 5,800           | 1,742             |
| 3                               | 7,634           | 2,292             |
| 4                               | 5,122           | 1,538             |
| 5                               | 2,301           | 0,691             |
| 6                               | 4,018           | 1,207             |
| 7                               | 2,863           | 0,860             |
| 8                               | 3,654           | 1,097             |
| 9                               | 2,639           | 0,792             |
| 10                              | 2,719           | 0,817             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>4,257</b>    | <b>1,278</b>      |
| <b>SD</b>                       | 1,768           | 0,531             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 41,538          | 41,538            |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 1,096           | 0,329             |

Za uzorke u tablici 7 srednja vrijednost koncentracije iznosi 1,278 mg vitamina E na 100 g žumanjka što je najmanja izmjerena koncentracija u odnosu na sve analizirane

skupine. Vrijednost RSD, ako u obzir uzmemo sve uzorke, je visoka i iznosi 41,538 % što je za uzorke reda veličine mg/L (ppm) prevelika vrijednost. U ovoj skupini uzorke možemo podijeliti u dvije skupine: kod 5 uzoraka izmjerena koncentracija vitamina E je od 1,207 do 2,292 mg/100 g žumanjka i u toj skupini RSD vrijednost je dvostruko manja 23,173 %. Kod drugi 5 uzoraka koncentracija vitamina E iznosi 0,691 do 1,097 mg/100 g žumanjka, a RSD vrijednost je 17,711 %. Ovako visoke vrijednosti RSD vrijednosti mogu se objasniti kao posljedica analize bioloških uzoraka koji nisu jednaki jer ovise o ishrani i metabolizmu svake koke nesilice.

Nešto veća koncentracija vitamina E izmjerena je u jajima kupljenim u trgovačkom lancu 2 (1,636 mg/100 g žumanjka), a rezultati su prikazani u tablici 8. Vrijednost RSD iznosi 10,880 % što je još uvijek veće od prihvatljivih 5 % .

Tablica 8. Koncentracija vitamina E u jajima kupljenima u trgovačkom lancu 2

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 5,348           | 1,606             |
| 2                               | 5,640           | 1,694             |
| 3                               | 5,638           | 1,693             |
| 4                               | 5,946           | 1,786             |
| 5                               | 5,364           | 1,611             |
| 6                               | 3,838           | 1,153             |
| 7                               | 5,565           | 1,671             |
| 8                               | 5,787           | 1,738             |
| 9                               | 5,631           | 1,691             |
| 10                              | 5,71            | 1,715             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>5,447</b>    | <b>1,636</b>      |
| <b>SD</b>                       | 0,593           | 0,178             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 10,880          | 10,880            |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 0,367           | 0,110             |

Tablica 9: Koncentracija vitamina E u jajima kupljenima u trgovačkom lancu 3

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 6,386           | 1,918             |
| 2                               | 7,280           | 2,186             |
| 3                               | 6,365           | 1,911             |
| 4                               | 6,502           | 1,953             |
| 5                               | 6,265           | 1,881             |
| 6                               | 6,392           | 1,920             |
| 7                               | 6,112           | 1,835             |
| 8                               | 6,191           | 1,859             |
| 9                               | 5,943           | 1,785             |
| 10                              | 9,359           | 2,811             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>6,382</b>    | <b>1,916</b>      |
| <b>SD</b>                       | 0,377           | 0,113             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 5,907           | 5,907             |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 0,246           | 0,074             |

Najveća koncentracija vitamina E izmjerena je u jajima kupljenim u trgovačkom lancu 3 i iznosi 1,916 mg/100 g žumanjka. Iz izračuna srednje vrijednosti, ali i ostalih veličina izuzet je rezultat koji značajnije odstupa od srednje vrijednosti i označen je plavom bojom. I u daljnjim izračunima izuzete vrijednosti će biti označene plavom bojom. RSD vrijednost a ovu skupinu je 5,907 % što je blizu prihvatljive vrijednosti (5 %).

U tablicama 10, 11 i 12 prikazani su rezultati dobiveni za jaja prikupljena na dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva (obiteljska poljoprivredna gospodarstva bit će označena kao OPG 1 i OPG 2).

Tablica 10: Koncentracija vitamina E u jajima prikupljenim na OPG 1 – Skupina 1

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 3,922           | 1,178             |
| 2                               | 8,531           | 2,562             |
| 3                               | 4,156           | 1,248             |
| 4                               | 10,824          | 3,250             |
| 5                               | 1,465           | 0,440             |
| 6                               | 7,828           | 2,351             |
| 7                               | 7,031           | 2,111             |
| 8                               | 6,796           | 2,041             |
| 9                               | 9,719           | 2,919             |
| 10                              | 6,691           | 2,009             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>7,766</b>    | <b>2,332</b>      |
| <b>SD</b>                       | 1,187           | 0,356             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 15,279          | 15,279            |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 0,822           | 0,247             |

Tablica 11: Koncentracija vitamina E u jajima prikupljenim na OPG 1 – Skupina 2

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 7,404           | 2,223             |
| 2                               | 7,827           | 2,350             |
| 3                               | 8,137           | 2,444             |
| 4                               | 7,630           | 2,291             |
| 5                               | 8,767           | 2,633             |
| 6                               | 7,233           | 2,172             |
| 7                               | 7,377           | 2,215             |
| 8                               | 7,774           | 2,335             |
| 9                               | 7,567           | 2,272             |
| 10                              | 7,367           | 2,212             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>7,708</b>    | <b>2,315</b>      |
| <b>SD</b>                       | 0,459           | 0,138             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 5,951           | 5,951             |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 0,284           | 0,085             |

Na OPG 1 prikupljene su dvije skupine jaja. Vidljivo je da su koncentracije vitamina E u obje skupine slične vrijednosti, Skupina 1 – 2,332 mg/100 g žumanjka, a za Skupinu 2 – 2,315 mg/100 g žumanjka. Iako su koncentracije slične, RSD vrijednost se znatno razlikuje 15,279 % za Skupinu 1 i 5,951 % za Skupinu 2. Razlog toga ponovo može biti, kao što je ranije rečeno, priroda uzorka.

Nešto manja koncentracija vitamina E izmjerena je u jajima prikupljenima na OPG 2 – 2,071 mg/100 g žumanjka. RSD vrijednost i kod ove skupine je relativno visoka 14,631 %.

Tablica 12: Koncentracija vitamina E u jajima prikupljenim na OPG 2

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 8,021           | 2,409             |
| 2                               | 6,565           | 1,971             |
| 3                               | 6,094           | 1,830             |
| 4                               | 6,008           | 1,804             |
| 5                               | 7,689           | 2,309             |
| 6                               | 8,181           | 2,457             |
| 7                               | 3,960           | 1,189             |
| 8                               | 7,806           | 2,344             |
| 9                               | 5,956           | 1,789             |
| 10                              | 5,737           | 1,723             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>6,895</b>    | <b>2,071</b>      |
| <b>SD</b>                       | 1,009           | 0,303             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 14,631          | 14,631            |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 0,659           | 0,198             |

U tablici 13 prikazani su rezultati dobiveni mjerenjem koncentracije vitamina E u jajima nesilica koje su hranjenje krmnom smjesom obogaćenom vitaminom E.

Tablica 13: Koncentracija vitamina E u jajima obogaćenima vitaminom E

| uzorak                          | rezultat (mg/L) | mg/100 g žumanjka |
|---------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1                               | 16,504          | 4,956             |
| 2                               | 7,385           | 2,218             |
| 3                               | 13,996          | 4,203             |
| 4                               | 14,796          | 4,443             |
| 5                               | 13,663          | 4,103             |
| 6                               | 7,773           | 2,334             |
| 7                               | 13,167          | 3,954             |
| 8                               | 14,227          | 4,272             |
| 9                               | 12,055          | 3,620             |
| 10                              | 7,539           | 2,264             |
| <b>srednja vrijednost</b>       | <b>14,058</b>   | <b>4,222</b>      |
| <b>SD</b>                       | 1,386           | 0,416             |
| <b>RSD (%)</b>                  | 9,857           | 9,857             |
| <b>interval pouzdanosti (±)</b> | 1,027           | 0,308             |

Uz tri rezultata koja su izuzeta iz izračuna, koncentracija vitamina E je značajno viša od koncentracija izmjerenih u ostalim skupinama i iznosi 4,222 mg/100g žumanjka, dok je RSD vrijednost nešto viša 9,857 %.

Kada se usporede izmjerene koncentracije vitamina E u svim skupinama, vidljivo je da je koncentracija vitamina E najviša u obogaćenim jajima, nešto manja je u jajima prikupljenim na dva OPG dok ja najniža koncentracija izmjerena u jajima dostupnim u trgovačkim lancima. Rezultati su vidljivi u tablici 14.

Tablica 14. Usporedba koncentracije vitamina E po skupinama

| <b>uzorak</b>     | <b>mg/100 g žumanjka</b> |
|-------------------|--------------------------|
| obogaćena jaja    | 4,222                    |
| OPG 1 - Skupina 1 | 2,332                    |
| OPG 1 - Skupina 2 | 2,315                    |
| OPG 2             | 2,071                    |
| trgovački lanac 3 | 1,916                    |
| trgovački lanac 2 | 1,636                    |
| trgovački lanac 1 | 1,278                    |

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu vitamin E je iz uzoraka jaja ekstrahiran uz pomoć ultrazvuka a koncentracija je određivana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Ispitivan je utjecaj različitih parametara ekstrakcije na uspješnost ekstrakcije vitamina E iz žumanjka jajeta (utjecaj vremena ekstrakcije, temperature, utjecaj vremena ekstrakcije i temperature, te utjecaj amplitude UZV). Analiza realnih uzoraka provodila se na tri skupine komercijalno dostupnih jaja (trgovački lanac 1, 2, 3), dvije skupine jaja dobivena od nesilica s dva obiteljska poljoprivredna gospodarstva (OPG 1 i OPG 2), te jedna skupina jaja koja su obogaćena vitaminom E.

Rezultati određivanja koncentracije vitamina E pomoću ekstrakcije potpomognute ultrazvukom su veće u odnosu na klasičnu ekstrakciju tekuće–čvrsto, za 4 % odnosno 3 %. Utjecaj vremena ekstrakcije i temperature prikazuje da je pri temperaturi od 40 °C i vremenu ekstrakcije od 1 sata određena je najveća koncentracija vitamina E. Promjena amplitude UZV nema utjecaja na ekstrakciju vitamina E iz uzorka žumanjaka.

Najveća koncentracija vitamina E određena je u jajima obogaćenim vitaminom E, a iznosi 4,222 mg/100g žumanjka. Koncentracija vitamina E u jajima dobivenih od nesilica s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava iznosi 2,332 mg/100g žumanjka za OPG 1 – skupina 1, odnosno 2,315 mg/100g žumanjka za OPG 1 – skupina 2, dok za OPG 2 koncentracija vitamina E iznosi 2,071 mg/100g žumanjka. Za skupinu jaja – trgovački lanac 3 koncentracija vitamina E iznosi 1,916 mg/100g žumanjka, dok za skupini jaja – trgovački lanac 2 iznosi 1,636 mg/100g žumanjka. Najniža koncentracija vitamina E određena je u skupini jaja – trgovački lanac 1, a iznosi 1,278 mg/100g žumanjka.

Uzrok razlike u vrijednostima rezultata u koncentraciji vitamina E leži u sastavu hrane kojom se nesilice hrane. Povećana koncentracija vitamina E u jajima posljedica je dodatka vitamina E u hranu nesilica.



## 6. LITERATURA

- [1] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=64892#top> (27.4.2021.)
- [2] S. S Gropper, J. L. Smith, J. L. Groff, Advanced nutrition and human metabolism, Cengage Learning, Wadsworth, 2009.
- [3] <https://pubs.rsc.org/image/chapter/bk9781788012409/bk9781788012409-00001/bk9781788012409-00001-f1.gif> (27.4.2021.)
- [4] N. Etsuo, A. Kouichi, Croyal society of Chemistr, (2019), 1-11.
- [5] [https://hr.wikipedia.org/wiki/Preporu%C4%8Dene\\_dnevne\\_koli%C4%8Dine](https://hr.wikipedia.org/wiki/Preporu%C4%8Dene_dnevne_koli%C4%8Dine) (29.4.2021.)
- [6] <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/poblize-o-vitaminu-e-8021/> (29.4.2021.)
- [7] Z. Kneiwald, Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 1993.
- [8] <https://www.rječnik.com/Internacionalna%20jedinica> (4.5.2021.)
- [9] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=34154> (5.5.2021.)
- [10] F. Ziberi, I. Rezić, *TEDI*, 5 (2015), 21.
- [11] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- [12] [https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSp53bJHMFxfC6D031Cns9DX5z51hZ-Y74\\_Q&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSp53bJHMFxfC6D031Cns9DX5z51hZ-Y74_Q&usqp=CAU) (5.5.2021.)
- [13] M. Severović, Kromatografija kao analitička metoda za određivanje bioloških uzoraka, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2020.
- [14] D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, 2007.
- [15] [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fslideplayer.com%2Fslide%2F14267584%2F&psig=AOvVaw33x0N7c1Lnmi\\_1PxcWL2nx&ust=1620558803913000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCICbioz6ufACFQAAAAAdAAAAABAN](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fslideplayer.com%2Fslide%2F14267584%2F&psig=AOvVaw33x0N7c1Lnmi_1PxcWL2nx&ust=1620558803913000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCICbioz6ufACFQAAAAAdAAAAABAN) (8.5.2021.)
- [16] <http://struna.ihjj.hr/naziv/spetrofotometrija/4193/> (19.5.2021.)

- [17] M. Marunica, Uloga luteina u ljudskom organizmu i određivanje njegove koncentracije u jajima UV – VIS spektrofotometrijom, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2021.
- [18] M. Mihoci, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 64(11-12), (2015), 683-685.
- [19] Karnaš, M. Spektrofotometrijska studija sustava škrob – trijodid, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2012.
- [20] A. L. Bruinen, G. L. Fisher, R. Balez, A. M. Sar, L. Ooi, R. M. A. Heeren, *J. Am. Chem. Soc.*, 29, (2018), 1571-1581.
- [21] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (2.9.2021.)
- [22] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_Lab\\_Techniques\\_\(Nichols\)/04%3A\\_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction) (2.9.2021.)
- [23] [https://lh3.googleusercontent.com/proxy/at\\_dE671039W9tIHBOZKVby7YQJ8d9oJjNRnrhhSnetiGljtPp9HHb0TzPoz4cTv169HFIIHSVYQGibL1hdjKKsQV6RLqwo2cVHjGW5cN4zW2pDeWvxwzFW3CfyNg](https://lh3.googleusercontent.com/proxy/at_dE671039W9tIHBOZKVby7YQJ8d9oJjNRnrhhSnetiGljtPp9HHb0TzPoz4cTv169HFIIHSVYQGibL1hdjKKsQV6RLqwo2cVHjGW5cN4zW2pDeWvxwzFW3CfyNg) (2.9.2021.)
- [24] A. Rock, Određivanje vitamina E, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2018.
- [25] I. Kaselj, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek, 2012.
- [26] S. Liu, Q. Xie, J. Cao, P. Song, J. Chen, W. Bai, *J. Sep. Sci.*, 36, (2013), 1135-1141.
- [27] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=67594> (22.5.2021.)
- [28] [https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQoWWcOST6\\_WemWAMDLNLRg6IoFfTEKTbsZdmT3TOEqxZt-3NbY-GReR3gIOQ2AezVOOk&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQoWWcOST6_WemWAMDLNLRg6IoFfTEKTbsZdmT3TOEqxZt-3NbY-GReR3gIOQ2AezVOOk&usqp=CAU) (22.5.2021.)
- [29] A. Vukoja, Ultrazvuk i primjena, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za fiziku, Osijek. 2018.
- [30] H. Dermić, A. Režak Jambrak, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2(2), (2010), 22-33.
- [31] M. Čulig, Uporaba ultrazvuka u kemijskoj sintezi, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, 2018.
- [32] T. J. Mason, J. P. Lorimer, *Applied Sonochemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002.

- [33] I. Šimić, Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [34] Y. Li, Y. Chen, H. Li, *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, (2017), 281-288.
- [35] Y. Xie, B. Wu, Z. Wu, X. Tu, S. Wu, X. Lv, H. Yin, J. Xiang, H. Chen, F. Wei, *Journal of Food Chemistry*, 319, (2020), 126547
- [36] X. Yue, Z. Xu, W. Prinyawiwatkul, J. M. King, *Journal of Food Science*, 71, (2006), C239-C241.
- [37] B. Jiang, L. Wang, X. Wang, S. Wu, D. Li, C. Liu, Z. Feng, *Polymers*, 11(8), (2019), 1353.
- [38] T. Tsiaka, D. Z. Lantzouraki, E. Siapi, V. J. Sinanoglou, G. A. Heropoulos, A. C. Calokerinos, P. Zoumpoulakis, *Journal of Chromatography B*, 1906, (2018), 160-171.
- [39] S. Xiao, Y. Zhang, J. Xie, Z. Wen, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, (2018), 2844-2854.
- [40] A. Šalmaši, *Journal of Food lipids*, 16, (2009), 465-474.
- [41] Z. Kralik, G. kralik, M. Grčević, I. Kralik, V. Ganter, *Brazilian Journal of Poultry Science*, 20(1), (2018), 119-126.

## 7. ŽIVOTOPIS

**Petra Poredski**

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Odjel za kemiju**

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

### **Osobni podatci:**

Adresa: Palešnik 82, 43284 Hercegovac

petra.poredski@hotmail.com

099/768-5133

Datum i mjesto rođenja: 18.06.1997., Bjelovar

### **Obrazovanje:**

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

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

2012. – 2016. Medicinska škola Bjelovar, smjer: zdravstveno – laboratorijski tehničar

2004. – 2012. Osnovna škola Slavko Kolar Hercegovac

### **Ostale aktivnosti:**

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

2019./2020.- Sudjelovanje na manifestaciji „Advent kreativnosti“ u Osijeku

2019./2020. – Sudjelovanje na radionici Odjela za kemiju tijekom 23. Smotre Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku

2019./2020. – Sudjelovanje u MasKEMbalu i doprinos u promociji Odjela za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2020./2021.- Sudjelovanje na Festivalu znanosti