

# Ekstrakcija luteina ultrazvukom iz jaja obogaćenih luteinom

---

Ćosić, Jela

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:182:424771>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-24**

*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije, istraživački smjer

Jela Ćosić

Ultrazvučna ekstrakcija luteina iz jaja obogaćenih  
luteinom

Diplomski rad

Osijek, 2021. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjela za kemiju

Diplomski studij kemije, istraživački smjer

Jela Ćosić

Ultrazvučna ekstrakcija luteina iz jaja obogaćenim  
luteinom

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Olivera Galović

Komentor: doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2021. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

## ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA LUTEINA IZ JAJA OBOGAĆENIH LUTEINOM

Jela Ćosić

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

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

**Komentor:** doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

### Sažetak

Lutein je biljni pigment iz skupine karotenoida, odnosno ksantofila. Koncentracija luteina određivana je u osam skupina jaja. Tri skupine jaja kupljene su u tri različita trgovačka centra, dvije skupine proizvedene su na dva obiteljska gospodarstva. Tri skupine jaja su dobivene s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti (FAZOS), od kojih su: jedna skupina jaja fazana, druga skupina su jaja koka nesilica koje su hranjene krmnom smjesom obogaćenom luteinom, a posljednja skupina su jaja obogaćena luteinom i ostalim nutrijentima. Uporabom ultrazvučne ekstrakcije poboljšana je ekstrakcija luteina pa su vrijednosti koncentracija poboljšane za 8,95 %. Koncentracija luteina određivana je iz žumanjka jaja pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV detekcijom. Najmanja koncentracija luteina 0,7255 mg/100 g žumanjka određena je u jajima fazana, dok je najveća koncentracija luteina 5,4613 mg/100 g žumanjka, određena je u jajima koka nesilica koje su hranjene smjesom obogaćenom luteinom. Sve vrijednosti relativne standardne pogreške su veće od prihvatljivi 5 %, ali je važno napomenuti da se radi o 10 uzoraka jaja unutar svake skupine te da su jaja dobivena od različitih koka nesilica, što utječe na odstupanja relativne standardne pogreške.

**Diplomski rad obuhvaća:** stranica: 39, slika: 11, tablica: 8, literaturnih pregleda: 44

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** lutein, ultrazvučna ekstrakcija, žumanjak jajeta, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

**Rad prihvaćen:** 8.9.2021.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc.dr.sc. Tomislav Balić, predsjednik
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentor i član
3. doc.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, komentor i član
4. izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, 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 LUTEIN FROM LUTEIN-ENRICHED EGGS**

**Jela Ćosić**

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

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

**Cosupervisor:** Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof.

**Abstract**

Lutein is a plant pigment from the group of carotenoids, i.e. xanthophylls. Lutein concentration was determined in eight groups of eggs. Three groups of eggs were purchased in three different malls, two groups were produced on two family farms. Three groups of eggs were obtained from the Faculty of Agrobiotechnical Sciences (FAZOS), of which: one set of pheasant eggs, another set of eggs from laying hens fed with a lutein-enriched mixture, and the last set consisted of eggs enriched with lutein and other nutrients. The use of ultrasonic extraction improved the extraction of lutein, so the concentration values in analysed samples were improved by 8.95%. Lutein concentration was determined by high performance liquid chromatography with UV detection. The lowest concentration of lutein 0.7255 mg / 100 g of yolk was determined in pheasant eggs, while the highest concentration of lutein of 5.4613 mg / 100 g of yolk was determined in laying hen eggs fed with a lutein enriched mixture. All relative standard error values are greater than acceptable 5 %, but it is important to note that there are 10 egg samples within each group and that the eggs were obtained from different laying hens, which affects the deviations of the relative standard error.

**Thesis includes:** *pages: 39, figures:11, tables 8, references:44*

**Original in:** Croatian

**Keywords:** lutein, ultrasound assisted extraction, egg yolk, high performance liquid chromatography

**Thesis accepted:** 8.9.2021.

**Reviewers:**

1. Tomislav Balić, Ph.D., assistant prof., chair
2. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof., supervisor and member
3. Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof., cosupervisor and member
4. Martina Medvidović-Kosanović, Ph.D., associate professor substitute 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.

## Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. sc. Oliveri Galović na velikoj pomoći oko izrade i pisanja diplomskog rada te također na strpljenju i razumijevanju oko svih mojih pitanja i odgovora koje mi je pružila.

Također bih se htjela zahvaliti Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku koji su sudjelovali s donacijom jaja koja su bila potrebna za istraživanje, te OPG-ovima koji su također sudjelovali.

Posebnu zahvalu bih htjela uputiti svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili neizmjerne podrška i poticali me na daljnje učenje tijekom cijelog školovanja,

Hvala Vam !

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI DIO.....	2
2.1. Lutein .....	2
2.1.1. Karotenoidi.....	2
2.1.2. Biosinteza karotenoida .....	5
2.1.3. Metabolizam i bioraspoloživost karotenoida.....	6
2.1.4. Antioksidativna aktivnost karotenoida .....	8
2.1.5. Kemijska i fizikalna svojstva luteina.....	9
2.1.6. Izvori luteina u hrani .....	10
2.1.7. Važnost luteina u ljudskom zdravlju .....	11
2.1.8. Dosadašnja istraživanja .....	12
2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	15
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/VIS detektorom .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1. Pribor.....	19
3.2. Kemikalije .....	19
3.3. Instrumentacija .....	19
3.4. Uzorci .....	19
3.5. Ekstrakcija luteina .....	20
3.5.1. Ekstrakcija luteina potpomognuta ultrazvukom.....	21
3.6. Određivanje koncentracije luteina.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Odabir načina ekstrakcije .....	22
4.2. Odabir metode ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	23
4.3. Utjecaj amplitude ultrazvuka na ekstrakciju .....	23
4.4. Utjecaj trajanja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom.....	24
4.5. Odabrana metoda i uvjeti ekstrakcije luteina potpomognute ultrazvukom i HPLC analize .....	25
4.6. Određivanje koncentracije luteina u uzorcima jaja .....	25
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. POPIS LITERATURE.....	29
7. ŽIVOTOPIS .....	32



## 1. UVOD

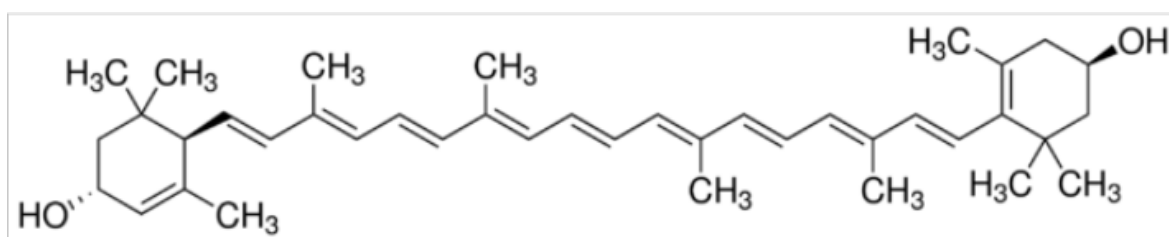
Lutein je pigment biljnog porijekla i dio je porodice karotenoida. Biološka aktivnost ovoga pigmenta pokazuje veliki antioksidativni potencijal i igra značajnu ulogu u prevenciji različitih bolesti. Biološki učinkovitu dozu teško je postići zbog njegove niske biološke pristupačnosti i bioraspoloživosti u izvorima hrane. Na ove čimbenike različito utječu svojstva matrice hrane, prerada i prisutnost drugih dijetalnih komponenata. Lutein se zajedno pojavljuje sa svojim izomerom, zeaksantinom. Oni su polarni karotenoidi koji se primarno talože u ljudskoj mrežnici i imaju različite zaštitne funkcije, tj. štite žutu pjegu (makulu) od oštećenja plavim svjetlom, štiti oko od ostalih očnih oboljenja i uklanjaj štetne kisikove čestice. Također, povezani su sa smanjenim rizikom od starosne degeneracije makule (AMD) i mrežnice, kardiovaskularnih bolesti i različitih karcinoma. Važno je svakodnevno prehranom unositi lutein u organizam jer ga tijelo ne može sintetizirati, kako bi upravo spriječili razvoj ovih bolesti.

Zadatak je ovog diplomskog rada je ekstrahirati lutein pomoću ultrazvuka i odrediti točnu koncentraciju luteina iz žumanjka jajeta, jer žumanjak je jedan od glavnih izvora luteina u prehrani čovjeka.

## 2. LITERATURNI DIO

### 2.1. Lutein

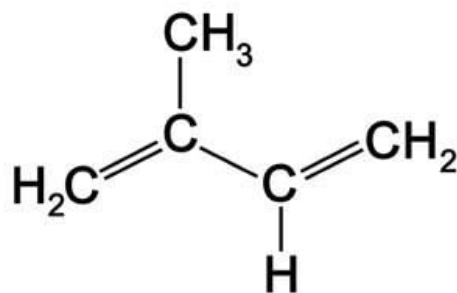
Lutein je pigment biljnog porijekla koji spada u skupinu karotenoida iz obitelji ksantofila. (Slika 1.) Obično se nalazi u kromoplastima biljaka, voću, povrću, žitaricama te žumanjku jajeta. U ljudskom organizmu može se naći u žutoj pjegi, odnosno makuli. Čovjek nije sposoban sintetizirati karotenoide *de novo* i prema tome, njihova je prisutnost u ljudskim tkivima u potpunosti dijetalnog podrijetla. Lutein je zajedno s  $\beta$ -karotenom jedan od najrasprostranjenijih karotenoida u voću i povrću koji se često konzumiraju u prehrani čovjeka. Upotreba luteina u prehrambenoj industriji ograničena je zbog njegove nestabilnosti i kemijskih promjena uzrokovanih tijekom prerade hrane. Proces koji mogu utjecati na integritet luteina uključuju visoke temperature, prisutnost kisika, svjetlosti i ekstremne promjene pH [1].



Slika 1. Strukturni prikaz luteina [2].

#### 2.1.1. Karotenoidi

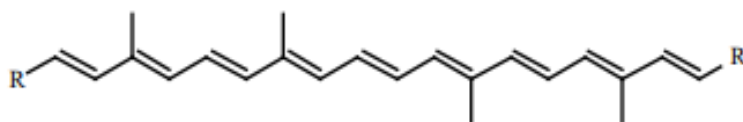
Karotenoidi su izoprenoidni polieni pigmenti od žute do crvene boje koji su široko rasprostranjeni u prirodi. Većina su tetraterpeni koji se sastoje od osam izoprenskih jedinica. Terpeni se kategoriziraju prema broju izoprenskih jedinica koje sadrže u svojoj strukturi (Slika 2.). Povezivanjem jedinica  $C_5$  nastaju terpeni koji se vežu prema pravilu „glava-rep“ ili „rep-rep“. Sintetiziraju se u biljkama i u nekim mikroorganizmima, a ljudi i životinje ne mogu sintetizirati terpene pa moraju unositi u organizam hranu koja je bogata karotenoidima. Izuzetno su fiziološki važni i ispunjavaju mnoge zadatke u ljudskom organizmu. Prvenstveno uvijek prate klorofil i pomažu fotosintezi i fototaksiji kao pomoćni apsorbenzi svjetlosti, a s druge strane mogu zaštititi biljke i mikroorganizme protiv pretjeranog zračenja [3].



Slika 2. Strukturni prikaz molekule izoprena [4].

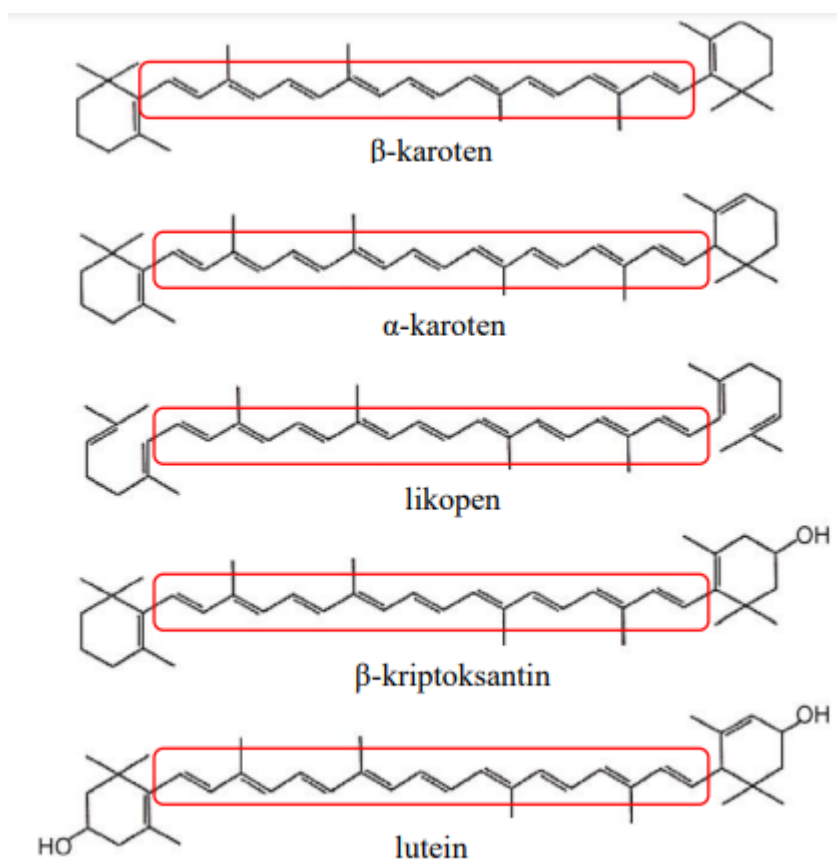
Najvažnije je strukturno obilježje karotenoida konjugirani polienski lanac. Izmjenične jednostruke i dvostruke veze tvore središnji dio molekule. Cijelom dužinom polienskog lanca nalaze se delokalizirani  $\pi$ -elektroni te zbog toga karotenoidi imaju jedinstvena kemijska svojstva, molekularni oblik i reaktivnost kemijske veze. Polienski lanac predstavlja kromofor koji je odgovoran za karakteristične boje: od bezbojne (fitoen) do žute (4,40-diaponeurosporene), narančaste ( $\beta$ -karoten), crvene (pigment paprike kapsantin), ružičaste (bakterioruberin) i plave sa sve većim brojem konjugiranih dvostrukih veza. Kad su povezani s proteinima kao, karotenoproteini nastaje tamnoplava boja, kao npr. krustacijanin (CR) u ljuskama jastoga. Nestabilni reakcijski međuprodukti, kao što su ioni karotenoidnih radikala, monokacije i dikacije, upijaju svjetlost u blizini infracrvenoga područja. Lanac je poliena odgovoran za nestabilnost karotenoida prema oksidaciji na zraku, jakim kiselinama, toplini, svjetlosti, što zahtijeva posebne mjere opreza tijekom izolacijskih procesa. Stoga, se rad s karotenoidima mora odvijati pod prigušenim svjetlom u inertnoj atmosferi te u odsutnosti jakih kiselina i peroksida [3,5].

Središnji dio molekule karotenoida sadrži četiri izoprenske jedinice. Središnje dvije, spojene rep-rep, te otvoreni lanac ili prstenasta struktura koji tvore krajeve lanaca. Ti ugljikovodici nazivaju se karoteni. U karotene ubrajamo:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\gamma$ -karoten, fitofluen i likopen. Ti su spojevi zaslužni za crvenu, narančastu i žutu boju voća i povrća poput bundeve, mrkve, lubenice i drugo. Velika većina prirodnih karotena imaju sve dvostruke veze u trans položaju gdje je R struktura otvorenog lanca ili prstenasti sustav (Slika 3.). Samo nekoliko prirodnih karotena pokazuju cis-trans konfiguraciju [5,6].



Slika 3. Prikaz R strukture otvorenog lanca [5].

Drugi dio karotenoidne strukture oksigenirani je derivat s raznim kombinacijama: hidroksi-, epoksi-, alkohol-, aldehid-, keto-, lakton-, funkcije karboksilnih kiselina, estera ili fenola. Ti spojevi nazivaju se ksantofili. Sadrže funkcionalne skupine s kisikom koje se nalaze na krajevima lanca, a ne unutar višekonjugiranog sustava. Nijedan heteroatom, osim kisika, nije prisutan u prirodi karotenoida. Žuta i zelena boja u špinatu, batatu, žumanjku, kukuruzu i drugim namirnicama dolazi od ksantofila. Glavni su predstavnici ove skupine: lutein, zeaksantin  $\beta$ -kriptoksantin i  $\alpha$ -kriptoksantin, (Slika 4.) [5,6].



Slika 4. Strukturni prikaz glavnih predstavnika karotenoida [7].

### 2.1.2. Biosinteza karotenoida

Biosinteza karotenoida regulirana je tijekom cijelog životnog ciklusa biljke i uključuje dinamične promjene sastava usklađene sa razvojnim zahtjevima i potrebama odgovora na vanjske podražaje iz okoline. Biosintetički put je reguliran na posebnim mjestima koja kontroliraju ulazak i prolazak metabolita kroz put.. Molekularna priroda mehanizma biosinteze karotenoida uključuje dokaze za povratnu vezu metabolita, transkripciju i epigenetsku kontrolu, kao i njihovo nakupljanje, skladištenje i razgradnju [8].

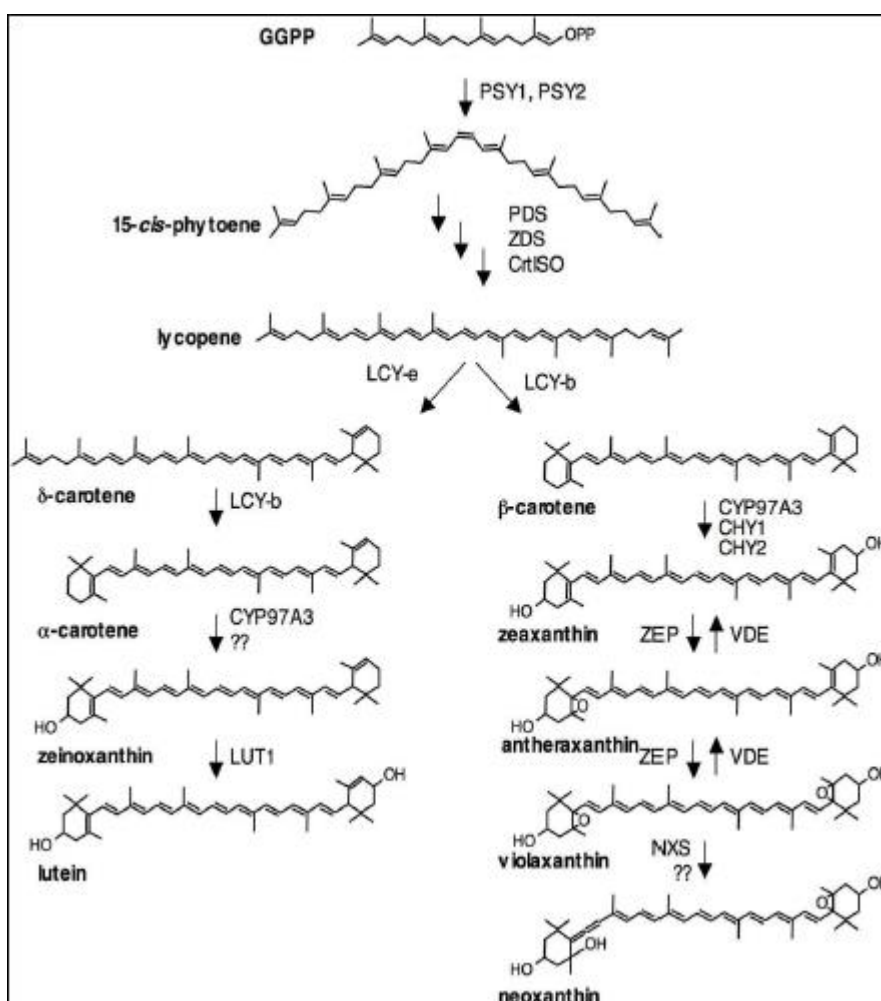
U biljkama se karotenoidi sintetiziraju unutar plastida pomoću enzima koji su kodirani u jezgri. Biosinteza karotenoida ovisi o dostupnosti izoprenoidnih supstrata. Karotenoidi nastaju 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfatnim putem (MEP) koji se odvija u plastidima, a kao početne spojeve koristi gliceraldehid-3-fosfat i piruvat iz kojih se sintetizira geranil-geranil-difosfata (GGPP) (Slika 5.). Kondenzacijom dva GGPP-a djelovanjem enzima fitoen-sintaze (PSY) nastaje fitoen, tj. prvi karotenoid. Prvi koraci MEP-a regulirani su deoksiksiluloza-5-fosfat sintazom (DXS) i 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfat reduktoizomerazom (DXR) [8,9].

Drugi ključni regulatorni enzim je 1-hidroksi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfat reduktaza (HDR), koji katalizira proizvodnju izopentil-difosfata (IPP) i dimetilalil-difosfata (DMAPP). Abiotski i biotski čimbenici mogu utjecati na dostupnost preteča izoprenoida. Svjetlosne i cirkadijalne oscilacije mogu promijeniti ekspresiju gotovo svih MEP gena i nekoliko karotenoidnih gena [8].

Biosinteza fitoena korak je koji ograničava brzinu karotenogeneze. PSY je općenito prihvaćen kao najvažniji regulatorni enzim u putu. Na transkripcijskoj razini *PSY* geni reagiraju na: apcisičnu kiselinu (ABA), jaku svjetlost, sol, temperaturu i sušu [8].

Regulacija biosinteze likopena potpomognuta je desaturazama, izomerazama i modifikatorima kromatina. Proizvodnja cjelokupnog trans-likopena iz fitoena zahtijeva složeni skup od četiri reakcije koje kataliziraju: fitoen-desaturaza (PDS), ζ-karoten izomeraza (Z-ISO), ζ-karoten desaturaza (ZDS) i karotenoid izomerazu (CRTISO) kao i fotoizomerizaciju posredovanu svjetlom. CRTISO koji katalizira *cis-trans* reakcije pri čemu izomerizira četiri *cis* veze koje uvode desaturaze, predstavlja regulatorni čvor na putu biosinteze. Enzim histon-metiltransferaza koji modificira kromatin potreban je za ekspresiju CRTISO-a [8,9].

Biosinteza karotenoida se dijeli nakon likopena kako bi se proizveli epsilon- i beta-karotenoidi pomoću enzimске aktivnosti dvije likopenске ciklaze, εLCY i βLCY. To ujedno igra glavnu ulogu u modulaciji omjera najzastupljenijeg karotenoida tj. luteina i β-karotenoida. U biosintezi luteina sudjeluju: *lut1*, e-hidroksilaza, *lut2*, εLCY, *ccr2* (hladni cirkadni regulator 2), CRTISO i *lut5*. Također, sadrži i β-hidroksilazu i regulatorni mutant SDG8 kromatina te *ccr1*. Razina luteina može se mijenjati stvaranjem likopena alternativnim putem koji ne zahtijeva stvaranje *cis*-karotena. Odsutnost CRTISO ili specifičnih izomera karotena smanjuje biosntezu luteina [8].



Slika 5. Strukturni prikaz sinteze karotenoida [10].

### 2.1.3. Metabolizam i bioraspoloživost karotenoida

Loša topljivost karotenoida u mastima utječe na njihovu nižu biodostupnost u odnosu na druge sastojke koji su topiviji u mastima. Na apsorpciju karotenoida utječe nekoliko čimbenika. Prerada hrane i kuhanje uzrokuju mehaničko razlaganje tkiva i oslobađanje karotenoida što poboljšava njihovu apsorpciju. Topljivost karotenoida u lipidima iz hrane

poboljšava raspršivanje u probavnoj tekućini u obliku emulzije. Probavljanje lipida iz hrane u emulziju nastavlja se pomoću želučane kiseline i lipolitičkih enzima. Na posljetku, karotenoidi se otapaju u tzv. miješanoj miceli. Kolesterol, slobodne masne kiseline, monoacilglicerol, fosfolipidi i žučne soli su dijelovi miješane micelle. Na prijenos mikroelemenata topivih u mastima u miješane micelle, tijekom lipolize lipida, pomoću lipaza mogu utjecati različiti čimbenici kao što je molekularna struktura mikroelemenata, pH, koncentracija lipida u žuči i prisutnost minimalne količine prehrambenih masti. Masnoća iz hrane potiče sok gušterače i izlučivanje žuči, što je neophodno za probavu lipida i stvaranje micela te osigurava lipide potrebne za strukturiranje miješanih micela. Pretpostavlja se da što je veći postotak lipidnih mikroelemenata ugrađenih u micelle, to je veća njegova učinkovitost apsorpcije [7,11].

Znanstvenici su dugo pretpostavljali da se apsorpcija odvija pasivnom difuzijom u tankom crijevu, s koncentracijskim gradijentom između količine karotenoida, u staničnoj membrani i miješanoj miceli. Dodatnim istraživanjem potvrđeno je prenošenje karotenoida pomoću različitih lipidnih membranskih transportera, koji prenose karotenoide u stanice sluznice crijeva olakšanom difuzijom. SR-BI (eng. Scavenger Receptor class B type I) prvi je istaknuti jednonančani transmembranski glikoprotein koji se nalazi na četkasto rubnoj membrani (BBM) enterocita od dvanaesnika do debelog crijeva. Sposoban je vezati lipoproteine i može olakšati selektivni ulazak velikog broja liganada u stanicu. Međutim, njegova osnovna uloga u crijevima je olakšavanje unosa nekolesterolnih lipida [11].

Drugi je sveprisutni receptor CD36 (*Cluster Determinant 36*), glikoprotein IV koji posjeduje široku specifičnost prema supstratima. Pretpostavlja se da igra ključnu ulogu u unosu masnih kiselina u crijeva, te sudjeluje u selektivnom transportu karotenoida. Također, uključen je u unošenje likopena i luteina u adipocite. Također se može i kolokalizirati s drugim proteinima, poput kaveolina-1, u lipidnim dijelovima. Stoga je moguće da između ovih proteina dođe do suradnje u usvajanju lipidnih mikroelemenata [11].

Dokazano je da se dio dostupnih karotenoida unese u stanice sluznice crijeva i izluči u limfu u obliku hilomikrona koji potom prelaze u krvotok. Kada se hilomikroni razgrade pomoću lipoproteinskih lipaza, jetra preuzimaju karotenoide iz ostatka hilomikrona. Karotenoidi se skladište u jetri ili se ponovno izlučuju u lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL) u krvotok, nadalje se prenose cirkulacijom u obliku lipoproteina niske gustoće (LDL). Na samom kraju tkiva upijaju karotenoide pomoću LDL receptora. Likopen,  $\beta$ -

karoten su jako hidrofobni karotenoidi koji su smješteni u unutarnjem dijelu LDL-a. Lutein i zeaksantin nalaze se na vanjskoj površini lipoproteinskih čestica i ravnomjerno su raspoređeni između LDL-a i HDL-a, jer su slabo hidrofobni karotenoidi. Masno tkivo i jetra su glavna skladišna tkiva karotenoida [12].

#### 2.1.4. Antioksidativna aktivnost karotenoida

Ljudski organizam izložen je raznim prooksidansima koji mogu oštetiti biološki značajne molekule, kao što su DNA, proteini, ugljikohidrati i lipidi. Među raznim obrambenim strategijama, karotenoidi su uključeni u uklanjanje dvije reaktivne vrste, a to su singletni molekularni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) i peroksil radikali. Oni su učinkoviti deaktivatori molekule koji sudjeluje u stvaranju radikala i singlet kisika [13].

Interakcija karotenoida s molekularnim singletnim kisikom uvelike ovisi o fizikalnom gašenju (engl. *physical quenching*), što uključuje direktan prijenos energije između obje molekule. Energija molekularnog singletnog kisika prenosi se u molekulu karotenoida da bi se dobilo osnovno stanje kisika i triplet pobuđeni karoten. Umjesto daljnjih kemijskih reakcija, karotenoid se vraća u početno stanje, „rasipajući“ svoju energiju interakcijom s okolnim otapalom. Za razliku od fizikalnog gašenja, kemijske reakcije između pobuđenog kisika i karotenoida su manje važne i doprinose manje od 0,05% od ukupne brzine gašenja. Budući da karotenoidi ostaju nedirnuti tijekom fizikalnog gašenja molekularnog singletnog kisika, oni se mogu ponovno koristiti nekoliko puta u takvim ciklusima gašenja. Učinkovitost karotenoida za fizikalno gašenje povezana je s brojem konjugiranih dvostrukih veza prisutnih u molekuli što određuje njihove najniže trostruke razine energije.  $\beta$ -karoteni i strukturno srodni karotenoidi imaju triplet razine energije blizu one od molekularnog singletnog kisika, omogućujući tako prijenos energije [13].

Karotenoidi najučinkovitije reagiraju s peroksilnim radikalima u odnosu na razne druge radikale u organizmu koji također nastaju u oksidacijskim uvjetima. Peroksilni radikali nastaju procesom peroksidacije lipida, a uklanjanje ove vrste zaustavlja reakcijski slijed koji konačno dovodi do oštećenja lipofilnih odjeljaka. Bitna uloga karotenoida u zaštiti staničnih membrana i lipoproteina protiv oksidativnog oštećenja je u njihovoj lipofilnosti i specifičnosti spojeva koji uklanjaju peroksilne radikale. Antioksidativna aktivnost karotenoida ovisi o vezi s deaktiviranjem peroksilnih radikala stvaranjem radikalnih adukata koji tvore rezonancijski stabiliziran centralni ugljikov radikal. U njemu nespareni elektron nije više usredotočen na kisik, već se delokalizira preko konjugiranog poliena [13].

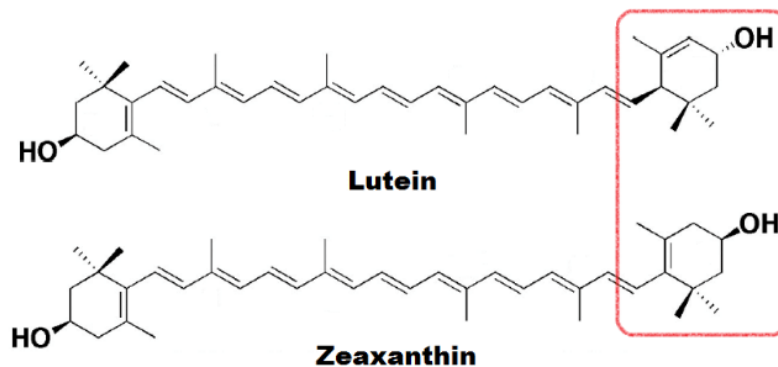


Antioksidativno djelovanje karotenoida ovisi o napetosti kisika prisutnog u sustavu. Pri niskim parcijalnim tlakovima kisika, kakav se nalazi u većini tkiva u fiziološkim uvjetima, utvrđeno je da  $\beta$ -karoten inhibira oksidaciju. Suprotno tome, početno antioksidativno djelovanje  $\beta$ -karotena prati prooksidativno djelovanje pri visokoj napetosti kisika. Znanstvenici su pretpostavili da bi prooksidativni učinak  $\beta$ -karotena mogao biti povezan sa štetnim učincima koji su uočeni kod dodavanja visokih doza  $\beta$ -karotena [13,14].

U biološkim sustavima izloženost svjetlu dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje štete biomolekulama i utječu na integritet i stabilnost substancijskih struktura, stanica i tkiva. Fotooksidativni procesi igraju glavnu ulogu u patobiokemiji nekoliko bolesti, koje većinom zahvaćaju dijelove tijela koji su izloženi svjetlu poput očiju i kože. Zaštita od fotooksidacijskih procesa povezana je s antioksidativnim djelovanjem makularnih karotenoida, luteina i zeaksantina, i njihovim učincima svjetlosnog filtriranja. Lutein i zaksantin pokazuju bolju efikasnost filtriranja od  $\beta$ -karotena i likopena. Posljedica je bolje učinkovitosti razlika u položaju ugrađenih molekula unutar liposomske membrane. Također, takve razlike mogu biti razlog zašto se makularni karotenoidi mogu smjestiti u membrane u višim količinama od ostalih karotenoida [13,15].

#### 2.1.5. Kemijska i fizikalna svojstva luteina

Lutein je pigment biljnog porijekla koji pripada skupini oksigeniranih karotenoida, tj. skupini ksantofila. Ksantofili posjeduju dvije hidroksilne skupine smještene na kraju supstituiranih prstena molekule. Dvije hidroksilne skupine u luteinu omogućuju nešto veću polarnost od ostalih karotenoida. Prisutnost hidroksilnih skupina na terminalnim prstenima uzrokuje provitaminsku neaktivnost luteina u ljudskom organizmu. Položaj dvostruke veze i geometrijska orijentacija prikazuju strukturne razlike između luteina i zeaksantina, odnosno njegovog izomera (Slika 6.). Lutein i zeaksantin mogu se međusobno pretvoriti u tijelu putem intermedijara koji se naziva mezo-zeaksantin. Molekulska formula luteina je  $C_{40}H_{52}O_2$ , a molekulska masa iznosi 568,886 g/mol.



Slika 6. Strukturni prikaz luteina i njegovog izomera zeaksantina [16].

Najtipičnije svojstvo luteina, kao i ostalih karotenoida, dugi je polieni lanac. Lutein se sastoji od niza od deset konjugiranih dvostrukih veza od kojih jedna pripada prstenu, a ostale ugljikovodičnom lancu. Takav konjugirani sustav dvostrukih veza određuje fotokemijska svojstva i kemijsku reaktivnost koje daju osnovne biološke funkcije karotenoida, poput antioksidativne aktivnosti. Polieni lanac osjetljiv je na oksidacijsku razgradnju svjetlošću i kemijski je nestabilan u prisutnosti kiselina [17].

Lutein je hidrofobna, lipofilna molekula netopljiva u vodi, što ograničava njegovo izravno ugrađivanje u proizvode bazirane na vodenom mediju. Topljiv je u mastima, uljima i krvi. Zbog svoje topljivosti u mastima ugrađuje se u hilomikrone koji se nalaze u crijevima i prenose ga do jetre. Osjetljiv je na kemijsku razgradnju uslijed oksidacije, koju promoviraju prooksidanti, povišene temperature, izloženost svjetlu i kisela okruženja. Lutein je u biljkama prisutan kao ester masnih kiselina koji je vezan s jednom ili dvije masne kiseline na dvije hidroksilne skupine [18].

#### 2.1.6. Izvori luteina u hrani

Lutein i zeaksantin prisutni su u lisnatom zelenom povrću, voću i povrću, poput paprike, kukuruza, graška te žumanjku jajeta. Kukuruz je povrće s najvećom količinom luteina (60%), a kivi, grožđe, špinat, naranča i tikva sadrže od 30 % do 40% ovog spoja [1].

Lutein je prvenstveno prisutan kao ester masne kiseline u određenim plodovima poput naranče, tikve i papaje. U zelenom lisnatom povrću prisutan je u nesterificiranom obliku u masnim kiselinama ili kao slobodni lutein. Unatoš istraživanjima, još nema točne procjene unosa i apsorpcije luteina u prehrani. Velik broj prehrambenih industrija dodaju lutein proizvodima ili su se usmjerile pozornost označavanja na svojstveni sadržaj luteina u

njihovim proizvodima. Iz toga razloga znanje o luteinu, stabilnost izomerizacije tijekom obrade i bioraspoloživost postali su jako važni [19].

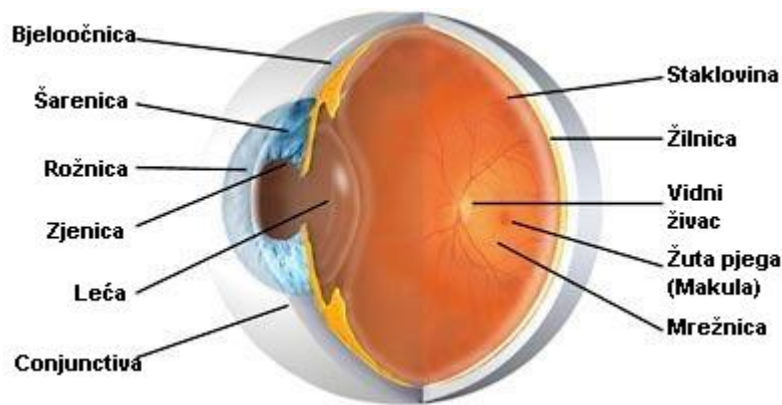
Bioraspoloživost luteina će se poboljšati tijekom pripreme hrane, blagom do umjerenom termičkom obradom. Neovisno o termičkoj obradi, struktura luteina doprinosi poboljšanju bioraspoloživosti barem u odnosu na  $\beta$ -karoten, jer lutein sadrži dvije hidroksilne skupine koje se nalaze na krajevima prstena, a povećana polarnost u odnosu na ostale karotenoide pogodno utječe na njegovu bolju apsorpciju i probavu u crijevima [19].

Jedan od najboljih izvora luteina je žumanjak jajeta jer je njegova bioiskoristivost veća iz žumanjka, nego u biljnim izvorima ili dodacima prehrani. Žumanjak jajeta je matrica sastavljena od probavljivih lipida, kolesterola, triacilglicerola i fosfolipida. Lutein i zeaksantin raspršeni su u matrici zajedno s mikrohranjivim tvarima topljivim u mastima, poput vitamina A, D i E. Lutein i zeaksantin biološki su dostupni zbog povezanosti s lipidnim matriksom žumanjka. Jaja obično sadrže 0,3 do 0,5 mg ukupnih ksantofila, s nešto više od polovice prisutnih u obliku luteina [20].

#### 2.1.7. Važnost luteina u ljudskom zdravlju

Pravilna prehrana koja je bogata luteinom važna je za sprječavanje bolesti te poboljšanje kardiovaskularnog i živčanog sustava, zdravlja očiju te za zaštitu kože u uvjetima izloženosti štetnim zračenjima. Zbog svog snažnog oksidacijskog djelovanja, karotenoidi utječu na smanjenje rizika od pojave zloćudnih tumora u ljudskom organizmu. Luteina u ljudskim tkivima u potpunosti je potječe iz hrane [21].

Raspodjela luteina među tkivima slična je ostalima karotenoidima, a zajedno sa zeaksantinom pronađena je u središtu mrežnice, zato se obično naziva i makularnim pigmentom. Lutein ima veliki afinitet prema perifernoj mrežnici i štapićima, a zeaksantin prema čunjićima. Njihova najveća koncentracija je u makuli, u aksonima fotoreceptora. (Slika 7.) Lutein selektivno apsorbira plavo svjetlo jer je njegova vršna apsorpcija unutar spektra na 446 nm. Plavo svjetlo nanosi 100 puta veću štetu u usporedbi s narančastom svjetlošću. Zbog svoje sposobnosti filtriranja, lutein je učinkovit u prevenciji oštećenja fotoreceptora uzrokovanih plavim svjetlom koje pokreće stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta tijekom fotokemijskih reakcija. Količina makularnog pigmenta obrnuto je povezana s učestalosti starosne makularne degeneracije (AMD), to je nepovratni proces koji je glavni uzrok sljepoće kod starijih osoba. Također, makularni pigmenti snažni su antioksidansi koji služe u prevenciji usporavanja pojave katarakte [1,22].



Slika 7. Slikovni prikaz građe oka [23].

Koža je najveći i najizloženiji organ na kojega djeluju štetni okolišni čimbenici koji mogu uzrokovati starenje i promjene na koži. Najčešće oštećenje kože uzrokovano je izlaganjem sunčevoj svjetlosti, a takvo oštećenje može uzrokovati karcinom kože zbog stvaranja štetnih radikala u koži. U istraživanju koje su proveli Palomba i sur. (2007.), ispitanici su svaki dan trebali oralno unijeti u organizam antioksidanse koji su sadržavali lutein i zeaksantin. Rezultati su bili bolja hidratacija i zaštićenost kože, povećana količina lipida u površinskom sloju kože i elastičnost, te smanjena hrapavost kože [24].

#### 2.1.8. Dosadašnja istraživanja

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća uloženo je puno napora u razvoj poboljšanih metoda ekstrakcije karotenoida. Međutim, obnavljanje iz kompleksnih matrica hrane ostaje niska, zbog različitih kemijskih i fizikalnih barijera prisutnih u matricama koje sprječavaju masovni transfer karotenoida tijekom ekstrakcije. Prisutnost raznolikih skupina karotenoida s različitim stupnjevima polarnosti također utječe na njihovu ekstrakciju. Zahvaljujući svojoj hidrofobnoj prirodi, karotenoidi se uobičajeno ekstrahiraju organskim otapalima. Nepolarna otapala, poput heksana, etera ili tetrahidrofurana (THF), odličan su izbor za ekstrakciju nepolarnih karotena ili esterificiranih ksantofila, dok polarna otapala, poput acetona, etanola i etil acetata prikladnija su za ekstrakciju polarnih karotenoida.

Glavne metode ekstrakcije koje se koriste u izolaciji karotenoida su: ekstrakcija Soxhletom, maceracija, mikrovalana ekstrakcija pomoću mikrovalne pećnice (engl. *microwave assisted extraction*, MAE) ili pomoću ultrazvuka (engl. *ultrasound assisted extraction*, UAE), ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *accelerated solvent extraction*, ASE) - također poznata kao ekstrakcija tekućine pod pritiskom (engl. *pressurized liquid extraction*, PLE) te pulsna ekstrakcija potpomognuta električnim poljem (engl. *pulsed electric field*

*assisted extraction*, PEF). Nadalje, koristi se i ekstrakcija superkričnim fluidom (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE), koja se često temelji na upotrebi superkričnog CO<sub>2</sub> (SCCO<sub>2</sub>) kao otapala, uz minimalnu uporabu organskih otapala poput etanola. Također, koristi se i ekstrakcija uz pomoć enzima (engl. *enzyme-assisted extraction*, EAE). Ove metode ekstrakcije razlikuju se u načinu degradacije stanica i stupnju primjene temperature i tlaka za ekstrakciju karotenoida. Tako primjerice, ASE i SFE rade na niskoj temperaturi i visokom tlaku dok UAE, PEF i EAE koriste ultrazvučne valove, visokonaponske impulse i celulolitičke enzime, za razgradnju stanica, što olakšava oslobađanje unutarstaničnih karotenoida [25].

Aceton, etil-acetat i metanol su najčešće korištena otapala za izolaciju luteina. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom utječe na poboljšanje izolacije luteina iz uzorka. Najčešće korištene analitičke metode koje se koriste za analizu uzoraka luteina su: tekućinska kromatografija visoke razlučivosti (HPLC), tekućinska kromatografija spregnuta s tandemskog masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), spektrofotometrijska analiza te tekućinska kromatografija ultravisoke razlučivosti (UHPLC) [26].

Analiza luteina, zeaksantina i drugih karotenoida u jajima predstavlja posebne izazove zbog visoke masnoće i sadržaja proteina u matrici žumanjka. Karotenoidi iz žumanjka ovise o njihovoj ekstrakciji organskim otapalom nakon čega slijedi korak pročišćavanja kako bi se uklonili koekstrahirani lipidi. Furusaw (2011.) je uveo ekstrakciju karotenoida iz uzorka žumanjka za analizu pomoću sustava s jednim otapalom [26,27].

Najbolja ekstrakcija za karotenoide pronađena je kod trostrukog sustava otapala koji su koristili Schlatterer i sur.(2006.), a koji se sastoji od petroletera, etil-acetata i metanola u volumnom omjeru 1:1:1. Za ekstrakciju ksantofila iz matriksa žumanjka je najpogodnija je kombinacija aceton, metanol i 0,5 M trietilamonijev acetat u volumnom omjeru 14:5:1 [28].

Yue i sur. (2006.) koristili su ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom kako bi ekstrahirali lutein iz žumanjaka jajeta. Ova se metoda pokazala znatno učinkovitijom od metode ekstrakcije s jednim otapalom. Nakon ekstrakcije, ksantofili iz žumanjka mogli su se odvojiti i kvantificirati [29].

Profil karotenoida znatno ovisi o prehrani kokoši. To znači da se vrsta i količina karotenoida u žumanjku može jako razlikovati i manipulirati hranom za perad. Schlatterer i sur. (2006.) dokazali su da različiti uvjeti uzgoja daju jaja s različitim sastavom karotenoida

u žumanjku zbog razlika u iskorištavanju hrane. Od kukuruznih proizvoda koristi se žuto kukuruzno brašno kao dodatak u prehrani peradi. Također, sadržaj luteina i zeaksantina u obogaćenom sirovom jajetu vidi se kod kokoši uzgajanih na dobro definiranoj hrani. Velike količine luteina, (1774 $\mu$ g/ 100g), nađene su u žumanjku iz ekološkog uzgoja koji su bili viši od ostalih sustava koji uključuju kavezni uzgoj i uzgoj u žitnici. Uzrok je tomu, vjerojatno, što su kokoši iz ekološkog sustava imali pristup tamnozelenoj lisnatoj vegetaciji na njihovim pašnjacima, dok kokoši u ostalim sustavima nisu imali takve uvjete [28].

U istraživanju koje su izveli Lin i sur. (2014.), uočeno je da je lutein posebno vrijedan proizvod dobiven iz biomase mikroalgi, kada se mikroalge koriste za smanjenje emisije CO<sub>2</sub> iz glavnih industrijski sektora, poput dimnih plinova u elektranama. Međutim, potrebni su još istraživački i razvojni naponi za postizanje brzog uzgoja sojeva algi s visokim sadržajem luteina [30].

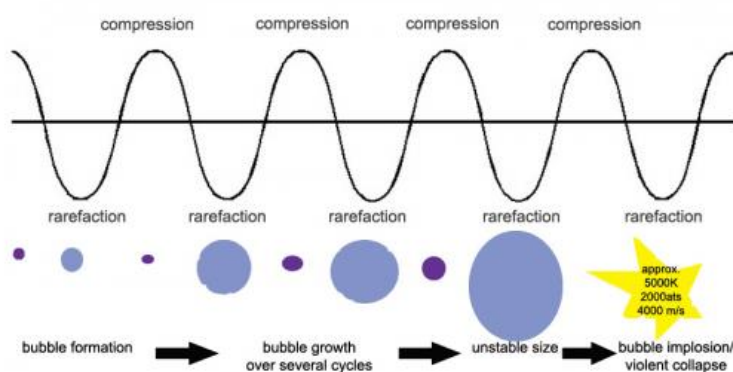
Jin i sur. (2009.), su nano-kapsulirali lutein s hidroksipropilmetil celuloznom ftalatom (HPMCP) kako bi lutein održao svoju bioaktivnost i izbjegao termičku ili svjetlosnu razgradnju. Za pripremu nano-kapsule luteina i HPMCP koristili su superkrično protuotapalo. Istraženi su učinci nekoliko radnih parametara na prinos, opterećenje luteinom, učinkovitost inkapsulacije, veličinu i raspodjelu veličine nano-kapsule. Srednji promjer nano-kapsula kretao se od 163 nm do 219 nm pod odgovarajućim eksperimentalnim uvjetima. Rezultat skenirajućeg elektronskog mikroskopa pokazao je da su nano-kapsule gotovo sferne. Najveći prinos 95,35 %, postignut je kada je početna koncentracija bila zasićena. Najveće opterećenje luteinom od 15,80 % i učinkovitost inkapsulacije od 88,41 % dobiveno je u uvjetima od 11 MPa, 40 °C i omjeru CHPMCP i luteina, 5:1. Rezultati ukazuju na to da se lutein može primijeniti u prehrambenoj industriji [31].

Chew i sur. (2015.) su proveli istraživanje *The Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) u kojem dokazuju formulaciju za tretman degeneracije makule koja sadrži vitamin C, E, beta-karoten i cink s bakrom. Studija očnih bolesti oka 2 (AREDS2) procijenila je vrijednost zamijene luteina i zeaksantina u AREDS formulaciji zbog dokazanog rizika od raka pluća od  $\beta$ -karotena kod pušača i bivših pušača. Kao što je prethodno izvješteno u sekundarnoj analizi, sudionici, AREDS2 koji su uzimali lutein i zeaksantin s ili bez omega-3 masnim kiselinama imali su nešto nižu stopu napredovanja AMD-a od sudionika koji nisu uzimali lutein i zeaksantin [32].

## 2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ultrazvučna ekstrakcija je tehnika koja se koristi za izolaciju bioaktivnih spojeva, poput vitamina, polifenola, polisaharida, karotenoida i drugih fitokemikalija, iz biljnih vrsta. Budući da je ultrazvučna ekstrakcija vrlo učinkovita metoda za izolaciju, ona znatno smanjuje troškove i vrijeme ekstrakcije. Temelji se na principu rada akustične ili ultrazvučne kavitacije. Ultrazvučna ekstrakcija koristi akustične valove u rasponu od kiloherca koji putuju kroz otapalo stvarajući kavitacijske mjehuriće. Učinak ultrazvuka znatno je bolji i korisniji pri nižim frekvencijama tj., od 20 do 40 kHz, dok je gotovo zanemariv u rasponu od 400 do 800 kHz, jer upravo kod frekvencija od 20 do 40 kHz djeluju mehanički učinci fenomena kavitacije kao što su turbulencije i strujanja tekućine. Ultrazvučna ekstrakcija postiže se kada se ultrazvučni valovi velike snage i niske frekvencije povežu u finu kašu koja se sastoji od biljnog materijala u otapalu. Ultrazvučni valovi putuju kroz otopinu stvarajući izmjenične cikluse visokog i niskog tlaka što rezultira pojavom akustične ili ultrazvučne kavitacije. Ultrazvučna kavitacija dovodi do ekstremnih temperatura, tlakova, brzina zagrijavanja ili hlađenja, razlika tlaka i velikih sila u mediju [33].

Kavitacija pruža veći dotok otapala u materijal i povećava prijenos mase na stanični materijal, tj. stanične stijenke. Kada kavitacijski mjehurići implodiraju na površini materijala, interpatikularni sudari generiraju učinke poput površinskog ljuštenja, erozije, sonoporacije i poremećaja stanica. (Slika 8.) Uz to, implozija kavitacijskih mjehurića u tekućem mediju stvara makro i mikro- turbulencije. Ultrazvučno zračenje predstavlja način za poboljšavanje procesa prijenosa mase, jer ultrazvučna obrada rezultira kavitacijom i s njom povezanim mehanizmima, kao što su mikropokretanje, strujanje, kompresija i dekompresija. Kada stanična stjenka pukne dolazi do doticaja sa sadržajem stanice te se tako ubrzava ekstrakcija i povećava njena efikasnost [33,34].



Slika 8. Shematski prikaz akustične kavitacije i njenih hidrodinamičkih sila [33].

Ultrazvuk može pomoći procesima ekstrakcije kroz poremećaj stanica i povećanjem prijenosa mase u graničnom sloju koji okružuje čvrsti matriks. Sonoporacija, perforacija staničnih stijenki i membrana, povećava propusnost staničnih stijenki i membrana i često je srednji korak prije nego što stanice u potpunosti unište ultrazvukom. Mehanički učinci kavitacije inducirane ultrazvukom, kao što su razlike u toplini i tlaku, udarni valovi, posmične sile, mikro-strujanja, pojačavaju prodor otapala u unutrašnjost stanice i poboljšavaju prijenos mase između stanice i otapala tako da međustanični materijali prenose u otapalo [33].

Za ekstrakciju se preferira primjena ultrazvuka jer vodena kupka za ultrazvučnu obradu često je dostupna u većini analitičkih laboratorija. Upotreba ultrazvuka poboljšava disperziju i učinkovitost bilo koje ekstrakcije te istovremeno smanjuje vrijeme ekstrakcije zbog jednostavnosti izvođenja (Slika 9.) [35].



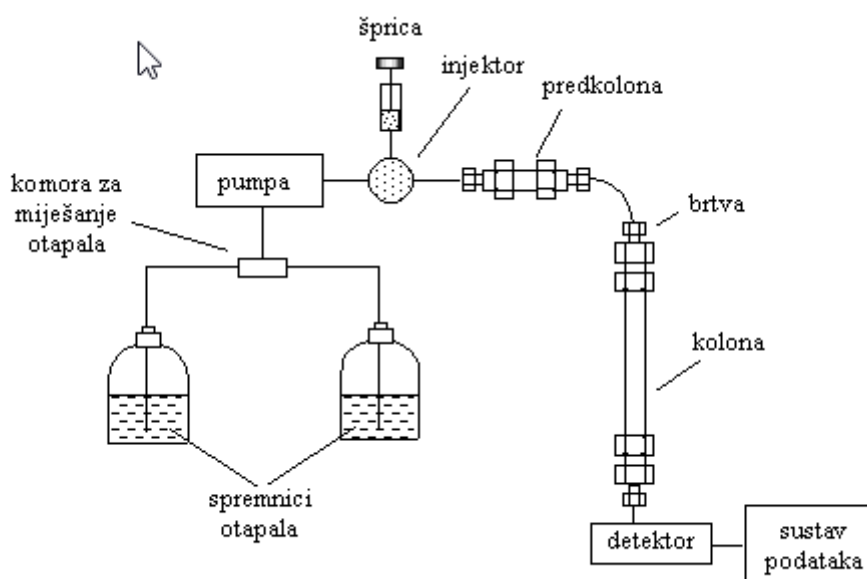
Slika 9. Prikaz aparature za ultrazvučnu ekstrakciju [36].

### **2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s UV/VIS detektorom**

Kromatografska analiza je analiza koja se zasniva na razdvajanju komponenata na temelju različite raspodjele mobilne i stacionarne faze. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je tekućinska kromatografija u kojoj se tekuća pokretna faza, odnosno mobilna faza se mehanički pumpa kroz kolonu koja obuhvaća stacionarnu fazu. HPLC analiza često se koristi u medicinskim, kliničkim, farmaceutskim, biokemijskim i kemijskim analizama. Razlika HPLC metode u odnosu na klasičnu tekućinsku kromatografiju je upotreba visokog tlaka pomoću pumpe, što zapravo smanjuje vrijeme odvajanja supstanci



analita. HPLC instrument sastoji se od injektora, pumpe, kolone koja je ispunjena stacionarnom fazom, a detektor identificira dobivene podatke u obliku kromatograma (Slika 10.). Kromatografiju možemo opisati pomoću četiri glava termina: kapacitet, učinkovitost, selektivnost i razlučivost. Kapacitet i selektivnost kolona su varijable kojima u velikoj mjeri upravlja proizvođač kolona, dok učinkovitost i razlučivost mogu donekle kontrolirati kromatografi. Da bi se postiglo najbolje moguće razdvajanje, učinkovitost kromatografskog sustava mora se optimizirati kako bi se širenje opsega svelo na najmanju moguću mjeru. Kolona bi trebala imati sposobnost zadržavanja otopljenih tvari i trebala bi imati odgovarajuću selektivnost za analizu analita od interesa [37].



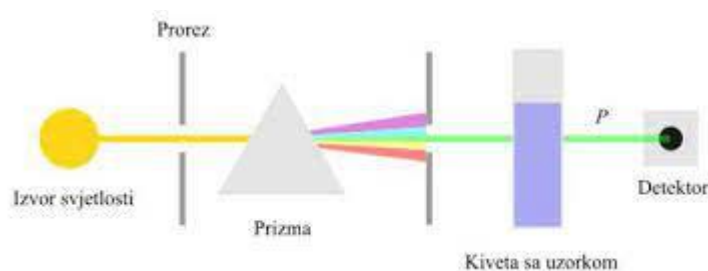
Slika 10. Shematski prikaz dijelova HPLC kromatografa [38].

Kromatografske kolone dijele se na kolonu normalnih faza i kolonu obrnutih faza. Kolona normalnih faza sadrži nepolarnu mobilnu fazu i polarnu stacionarnu fazu. Kolona obrnutih faza sadrži polarnu mobilnu fazu te nepolarnu stacionarnu fazu [39].

Detektor sadrži protočnu ćeliju koja detektira svaki složeni spoj u pozadini mobilne faze. Odgovarajući detektor ima sposobnost osjetiti prisutnost spoja i poslati njegov odgovarajući električni signal računalnoj podatkovnoj stanici. Vrsta detektora ovisi o karakteristikama i koncentracijama spojeva koje treba razdvojiti i analizirati [40].

Razvijeno je nekoliko tipova detektora, ultraljubičasti (UV) apsorpcijski detektor, detektor fluorescentnih zraka, foto-diodni detektor, detektor indeksa loma, maseni spektrometar kao detektor HPLC-a i detektor električne vodljivosti. Najčešći tip detektora

je UV/Vis detektor, a on mjeri sposobnost analita da apsorbira svjetlo na određenim valnim duljinama u UV i Vis području. Apsorpcija elektromagnetskog zračenja u UV području je od 170 do 400 nm, a u Vis području je od 400 do 750 nm. Osjetljivost strogo ovisi o prirodi analita. Dijelovi UV/Vis detektor su: izvor zračenja, selektor valnih duljina, kivete s uzorkom i detektor (Slika 11.)[37,39].



Slika 11. Dijelovi UV/Vis detektora [41].

Funkcija detektora je nadziranje svjetlosti koja prolazi kroz eluent. Pri prolasku spoja kroz eluent, on apsorbira UV, spoj otopljen u eluentu kroz detektor upija dio svjetlosti, sprječavajući ga tako od dosezanja svjetlosnog senzora. Smanjenje svjetlosti rezultira električnom strujom koja izlazi iz detektora i uvodi u podatkovni sustav. Koncentracija otopljene tvari i intenzitet svjetlosti propuštene kroz protočnu ćeliju povezani su prema Lambert-Beerovom zakonu [37].

Mjerenje ove metode može se opisati transmitancijom  $T$ , a ona se temelji na usporedbi intenzitea propuštenog ( $P$ ) i upadnog zračenja ( $P_0$ ) (Jednadžba 1.).

$$T = P / P_0 \quad (1)$$

Koncentracija analita prikazana je Lamber-Berovim zakonom prema jednadžbi 2. koja povezuje apsorbanciju i transmitanciju kojom se izračuna točna koncentracija.

$$A = -\log(T) = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (2)$$

Iz jednadžbe 2. može se zaključiti da je koncentracija uzorka  $c$  (mol/L) proporcionalna apsorbanciji  $A$ , a obrnuto proporcionalna duljini puta svjetlosti kroz kivetu  $L$  (cm) i molarnoj apsorbivnosti  $\varepsilon$  (L/mol cm) [42].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Pribor**

- polipropilenske kivete za cetrifugu (50 mL)
- pipeta (5 mL)
- mikropipete (100 -1000  $\mu$ L)
- vialice za HPLC (1,5 mL)

#### **3.2. Kemikalije**

- aceton, pro analysis (Gram-mol, Hrvatska)
- n-heksan, HPLC čistoće (Carlo Erba, Francuska)
- metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska)
- etilacetat (Fisher Scientific, UK)
- tetrahidrofuran, HPLC čistoće (Fisher Scientific, UK)
- 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), 99% (Acros Organics, Njemačka)

#### **3.3. Instrumentacija**

- analitička vaga (KERN, Njemačka)
- laboratorijska tresilica (vorteks) (IKA, Njemačka)
- magnetska mješalica s grijačem (IKA, Njemačka)
- centrifuga (Centric 200R, Tehnica)
- sustav za ultrazvučnu homogenizaciju (Sonoplus 3100, Bandelin, Berlin, Njemačka)
- tekućinski kromatograf visoke razlučivosti (Shimadzu, Japan),
- kolona: Shim-pack GIST C-18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) (Shimadzu, Japan).

#### **3.4. Uzorci**

Odabir metode i parametara ekstrakcije potpomognute ultrazvukom rađeni su na jajima dostupnim u trgovačkim centrima. Nakon odabira metode ekstrakcije i parametara ultrazvučne ekstrakcije, koncentracija luteina određena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Uzorci u kojima je određivana koncentracija luteina prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Skupine jaja u kojima se određivala koncentracija luteina

mjesto nabave uzoraka	oznaka
trgovački centar 1	TC1
trgovački centar 2	TC2
trgovački centar 3	TC3
obiteljsko gospodarstvo 1	OG1
obiteljsko gospodarstvo 2	OG2
FAZOS-jaja fazana	JF
FAZOS-jaja obogaćena luteinom	LUT
FAZOS-jaja obogaćena luteinom i drugim nutricinima	Q

### 3.5. Ekstrakcija luteina

Ispitane su dvije metode ekstrakcije luteina iz žumanjka jaja:

#### Metoda 1

Metodu 1 (M1) koristili su Leeson i suradnici [43]. Odvagano je 0,5 g uzorka žumanjka jaja i dodano je 5 mL acetona. Smjesa je miješana pomoću laboratorijske tresilice 20 sekundi te je ostavljena na tamnom mjestu 1 sat. Nakon 1 sata, 1 mL supenatanta je uzet i prenesen u HPLC vialicu te je aceton uparen. U vialicu je potom dodan 1 mL otapala heksan:etilacetat = 65:35 i uzorak je spreman za HPLC analizu.

#### Modificirana metoda 1

U modificiranoj metodi 1 (MM1), masa uzorka i volumen ekstraktanta ostali su isti kao i u metodi 1. Ekstrakcija je potpomognuta ultrazvukom uz korištenje ultrazvučne sonde (sonikacija) u trajanju od 2 minute prema ranije odabranim parametrima i uzorak je ostavljen 1 sat na tamnom mjestu. Nakon 1 sata, uzorak je centrifugiran 10 minuta na 10 000 g, 1 mL supernatanta je prenesen u HPLC vialice, nakon uparavanja acetona dodan je 1 mL otapala heksan:etilacetat = 65:35.

#### Metoda 2

Metoda 2 (M2) modificirana je metoda autora Yue i suradnici [29]. Odvagano je 0,5 g uzorka žumanjka jaja i dodano je 5 mL heksana. Uzorak je podvrgnut sonikaciji u trajanju od 2 minute prema prethodno određenim uvjetima. Nakon sonikacije uzorak sa ekstraktantom centrifugiran je na 10 000 g u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja 1 mL supernatanta prenesen je u vialicu, heksan je uparen i potom je dodan 1 mL metanola. Uzorak je spreman za HPLC analizu.

## Modificirana metoda 2

U modificiranoj metodi 2 (MM2) uzorak nije podvrgnut sonikaciji, već je izmiješan pomoću laboratorijske tresilice 20 sekundi i ostavljen 1 sat na tamnom mjestu. Nakon 1 sata stajanja, uzorak je centrifugiran, ekstraktant uparen i dodano je otapalo.

### 3.5.1. Ekstrakcija luteina potpomognuta ultrazvukom

Nakon dodatka ekstraktanta, ekstrakcija luteina iz žumanjka jaja potpomognuta je ultrazvukom uz korištenje ultrazvučne sonde (UVZS). U smjesu žumanjka i ekstraktanta, uronjena je ultrazvučna sonda MS 73 mikrotip, a parametri su bili sljedeći:

- amplituda 70 %,
- interval ultrazvuka 2 s,
- interval pauze 1 s,
- ukupno vrijeme trajanja 2 min.

### 3.6. Određivanje koncentracije luteina

Koncentracija luteina određivana je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti prema sljedećim uvjetima:

- protok: 1 mL/min
- temperatura pećnice: sobna temperatura
- vrijeme trajanja analize: 10 min
- valna duljina: 450 nm
- injektirani volumen: 20  $\mu$ L
- mobilna faza: metanol:tetrahidrofuran = 9:1
- retencijsko vrijeme: 5,1 min.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Odabir načina ekstrakcije

Na dva različita uzorka jaja uspoređene su metode 1 i modificirana metoda 1 (tablica 2.) te metoda 2 i modificirana metoda 2 (tablica 3.).

Tablica 2. Prikaz rezultata dobivenih uspoređivanjem metode 1 i modificirane metode 1

metoda	uzorak	UVZS	mg/L (ppm)	mg/100g	srednja vrijednost mg/100g
M1	1	ne	0,49570	0,49570	0,54492
	2		0,59414	0,59414	
	3		0,36960	0,36960	
MM1	1	da	0,65163	0,65163	0,59372
	2		0,53581	0,53581	
	3		0,35143	0,35143	

Iz rezultata prikazanih u tablici 2. vidljivo je da je pomoću modificirane metode 1 koncentracija luteina u uzorcima bila malo veća (8,95%), što ukazuje na nešto bolju ekstrakciju luteina ukoliko je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.

U ovoj i svim sljedećim tablicama vrijednosti koje nisu uzete u račun bit će označene plavom bojom.

Tablica 3. Prikaz rezultata dobivenih uspoređivanjem metode 2 i modificirane metode 2

metoda	uzorak	UVZS	mg/L (ppm)	mg/100g	srednja vrijednost mg/100g
MM2	1	ne			pik nije detektiran
	2				
	3				
M2	1	da	1,15600	1,15600	1,69656
	2		1,61844	1,61844	
	3		1,77467	1,77467	

Kod ekstrakcije modificiranom metodom 2, koncentracija luteina nije mogla biti određena zbog vrlo slabe ekstrakcije, dok je metodom 2 (uz ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom), koncentracija luteina uspješno određena.

Za daljnje ekstrakcije odabrana je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UVZS).

#### 4.2. Odabir metode ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Na istom uzorku žumanjka jaja uspoređene su MM1 i M2. Usporedba je rađena prema tablici 4. u kojoj su prikazani i dobiveni rezultati.

Tablica 4. Usporedba MM1 i M2 i prikaz dobivenih rezultata

ekstraktant	otapalo	mobilna faza	uzorak	mg/L (ppm)	mg/100g	srednja vrijednost mg/100g
aceton	heksan:etilacetat 65:35	metanol:aceton 9:1	1	1,69612	1,69612	1,72483
			2	1,64383	1,64383	
			3	1,83455	1,83455	
aceton	metanol	metanol:aceton 9:1	1	1,98474	1,98474	2,19491
			2	2,30365	2,30365	
			3	2,29634	2,29634	
heksan	heksan:etilacetat 65:35	metanol:aceton 9:1	1	0,91481	0,91481	0,88495
			2	0,89123	0,89123	
			3	0,84881	0,84881	
heksan	metanol	metanol:aceton 9:1	1	1,38435	1,38435	1,51683
			2	1,47840	1,47840	
			3	1,68774	1,68774	
aceton	heksan:etilacetat 65:35	metanol:THF 9:1	1	2,35088	2,35088	2,36063
			2	2,24242	2,24242	
			3	2,48860	2,48860	
aceton	metanol	metanol:THF 9:1	1	1,89265	1,89265	2,08685
			2	2,09963	2,09963	
			3	2,26827	2,26827	

Prema dobivenim rezultatima odabrana je modificirana metoda 1 (MM1) jer je za iste uzorke žumanjaka jaja dala najbolje rezultate. U daljnjem istraživanju u MM1 kao ekstraktant je korištena smjesa 4 mL acetona i 1 mL 0,2% otopine BHT u acetonu.

#### 4.3. Utjecaj amplitude ultrazvuka na ekstrakciju

Rezultati dobiveni ispitivanjima utjecaja amplitude ultrazvuka na ekstrakciju luteina prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Usporedba amplitude ultrazvuka na ekstrakciju luteina

amplituda (%)	uzorak	mg/L (ppm)	mg/100g	srednja vrijednost mg/100g
50	1	0,23890	0,23890	0,48366
	2	0,55179	0,55179	
	3	0,14396	0,14396	
	4	0,47594	0,47594	
	5	0,42324	0,42324	
70	1	0,25925	0,25925	0,48681
	2	0,57945	0,57945	
	3	0,38459	0,38459	
	4	0,58841	0,58841	
	5	0,39479	0,39479	

Iz rezultata je vidljivo da između rezultata dobivenih korištenjem amplituda 50 % i 70 % nema značajnijih razlika pa će se u daljnjem radu koristiti amplitude 70 %.

#### 4.4. Utjecaj trajanja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

U tablici 6. prikazani su rezultati dobiveni ispitivanjem utjecaja trajanja ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u trajanju od 2, 3 i 4 minute. Najveća koncentracija luteina dobivena je nakon 2 minute ekstrakcije luteina potpomognute ultrazvukom (1,83256 mg/100g), dok je nakon 3 minute koncentracija bila manja 10,86% (1,65303 mg/100g), a nakon 4 minute 7,45 % (1,70549 mg/100g).

U daljnjem radu koristit će se vrijeme od 2 minute.

Tablica 6. Rezultati dobiveni ispitivanjem utjecaja trajanja ekstrakcije luteina potpomognute ultrazvukom

trajanje UVZS (min)	uzorak	mg/L (ppm)	mg/100g	srednja vrijednost mg/100g
2	1	1,83220	1,83220	1,83256
	2	1,36154	1,36154	
	3	1,83292	1,83292	
3	1	1,51155	1,51155	1,65303
	2	1,60589	1,60589	
	3	1,70016	1,70016	
4	1	1,68144	1,68144	1,70549
	2	1,72953	1,72953	
	3	1,42881	1,42881	



#### 4.5. Odabrana metoda i uvjeti ekstrakcije luteina potpomognute ultrazvukom i HPLC analize

Tablica 7. Odabrana metoda i uvjeti ekstrakcije luteina potpomognute UVZS te HPLC analize

<b>EKSTRAKCIJA</b>	
masa uzorka	0,5 g
ekstraktant	aceton
V (ekstraktanta)	4 mL
V(0,2% BHT u acetonu)	1 mL
otapalo	heksan:etilacetat 65:35
V(otapala)	1 mL
<b>UVZS</b>	
amplituda	70%
interval ultrazvuka	2 s
interval pauze	1 s
ukupno vrijeme	2 min
sonda	MS 73 mikrotip
<b>HPLC</b>	
temperatura pećnice	sobna temperatura
valna duljina	450 nm
protok	1 mL/min
injektirani volumen	20 µL
vrijeme zadržavanja	5,1 min
ukupno vrijeme analize	10 min
mobilna faza	metanol:THF 9:1

Za analizu uzoraka odabrana je modificirana metoda 1 (MM1). Kemikalije potrebne za MM1, odabrani parametri ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i HPLC analize navedeni su u tablici 7.

#### 4.6. Određivanje koncentracije luteina u uzorcima jaja

Rezultati analize za sve skupine jaja prikazani su u tablici 8. Iz rezultata je vidljivo da su najmanje koncentracije određene u jajima koja su kupljena u trgovačkom centru (TC2) 0,7344 mg/100g i jajima fazana dobivenih s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti (FAZOS) 0,7255 mg/100g. Nešto veće koncentracije luteina određene su u jajima kupljenim u trgovačkom centru 1 (TC1) i trgovačkom centru 3 (TC3) kod kojih su koncentracije luteina bile 1,0443 odnosno 1,4911 mg/100g. Slična koncentracija luteina određena je u jajima sa

obiteljskog gospodarstva 1 (OG1) 1,4479 mg/100g. Veće koncentracije luteina određene su u jajima koja su obogaćena luteinom i drugim nutricinima 2,6886 mg/100g a najveće koncentracije su određene su u jajima s obiteljskog gospodarstva 2 4,5473 mg/100g i jajima dobivenim od koka nesilica koje su hranjene smjesom obogaćenom luteinom 5,4613 mg/100g. Sastav hrane koju su konzumirale koke nesilice uzrok je različitim koncentracijama luteina u jajima. No iako je sastav hrane bio različit određena koncentracija luteina u svim uzorcima jaja je veća od literaturnih podataka prema kojima koncentracija luteina u 100 g sirovog žumanjka iznosi 0,575 mg [44]. Relativna standardna devijacija (RSD) ili relativna standardna pogreška ukazuje na preciznost metode unutar skupine, a vrijednost koja se smatra prihvatljivom je do 5 %. Najmanje vrijednosti RDS dobivene su za skupine OG2 (7,931%), TC3 (8,676%) i TC2 (8,917%). Veće su vrijednosti dobivene za skupine LUT (15,198%), TC1 (17,166%), Q (20,758%), dok su najveće vrijednosti dobivene za skupine JF (23,172%) i OG1 (25,937%). Sve vrijednosti veće su od prihvatljivih 5%, no treba imati na umu da se radi o 10 uzoraka jaja unutar svake skupine i da su jaja vjerojatno dobivena od različitih koka nesilica. Zbog navedenog, ovako različite i visoke vrijednosti RDS možemo prihvatiti.

Tablica 8. Rezultati analize svih skupina jaja

skupina	TC1	TC2	TC3	OG1	OG2	JF	LUT	Q
uzorak	mg/100g							
1	1,0985	0,7844	1,2589	1,4717	4,5745	0,3423	6,0014	2,6474
2	1,2652	0,7819	1,5487	0,9856	4,6703	0,7997	6,0807	2,0309
3	0,4523	0,8103	1,6340	2,0203	4,7709	0,7658	5,4983	2,7255
4	1,1940	0,6737	1,6570	1,6757	5,1461	0,7038	6,6871	3,2315
5	0,7418	0,6782	1,5217	1,7694	4,7881	0,8542	6,1381	3,7458
6	1,1901	0,6084	1,5845	1,1311	4,6053	0,3676	4,2238	2,5369
7	1,0787	0,7739	1,3043	0,7442	4,0385	0,5115	4,4893	2,3120
8	1,0298	0,7521	1,5431	1,3932	4,2177	0,9451	4,9870	2,2792
9	1,0057	0,7816	1,4717	1,6656	4,1145	0,4987	3,8367	1,7872
10	0,7858	0,6991	1,5301	0,9185	3,8305	0,3792	5,0462	1,3317
<b>srednja vrijednost</b>	<b>1,0433</b>	<b>0,7344</b>	<b>1,4911</b>	<b>1,4479</b>	<b>4,5473</b>	<b>0,7255</b>	<b>5,4613</b>	<b>2,6886</b>
<b>SD</b>	0,179	0,065	0,129	0,376	0,361	0,168	0,830	0,558
<b>RSD %</b>	17,166	8,917	8,676	25,937	7,931	23,172	15,198	20,758
<b>interval pouzdanosti (±)</b>	0,117	0,041	0,085	0,245	0,236	0,125	0,542	0,387

## 5. ZAKLJUČAK

Lutein je pigment biljnog porijekla žute boje iz skupine karotenoida, odnosno obitelji ksantofila. Nalazi se u različitim namirnicama te ga je vrlo bitno konzumirati u svakodnevnoj prehrani kroz svježe voće, povrće i jaja. Osim svog velikog antioksidacijskog djelovanja u ljudskom organizmu, lutein ima i veliki utjecaj na zdravlje očiju, može spriječiti različita kardiovaskularna oboljenja te sudjeluje u zaštiti kože u uvjetima prekomjerne izloženosti štenim sunčevim zrakama. Lutein je glavni karotenoid koji je sastavni dio ljudske krvi i tkiva

U ovom radu analizirala se koncentracija luteina iz žumanjka jajeta u kojima je ekstrakcija luteina potpomognuta ultrazvukom. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti analizirane su koncentracije luteina sljedećih skupina jaja: jaja iz trgovačkog centra 1 (TC1), jaja iz trgovačkog centra 2 (TC2), jaja iz trgovačkog centra 3 (TC3), jaja s obiteljskog gospodarstva 1 (OG1), jaja s obiteljskog gospodarstva 2 (OG2), jaja fazana (JF), jaja obogaćena luteinom (LUT) i jaja obogaćena luteinom i drugim nutricinima (Q). Najniža vrijednost koncentracije luteina određena je u jajima koja su kupljena u trgovačkom centru 2 (TC2) i jajima fazana koja su dobivena s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti (FAZOS), a iznosila je 0,27255 mg/100g. Nešto viša koncentracija luteina određena je u jajima kupljenim u trgovačkom centru 1 (TC1) i trgovačkom centru 3 (TC3), a koncentracije luteina su iznosile 1,0443 odnosno 1,4911 mg/100g. Najveće koncentracije određene su u jajima s obiteljskog gospodarstva 2 (4,5473 mg/100g) te jajima dobivenih od koka nesilica koje su hranjene smjesom obogaćenom luteinom, čija je koncentracija iznosila 5,4613 mg/100g.

Rezultati analize pokazuju da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom daje bolje rezultate usporedno s klasičnim načinom ekstrakcije, što smo dokazali pomoću modificirane metode 1 (MM1). Također, jaja koja su obogaćena luteinom pokazuju višu koncentraciju luteina u žumanjku jajeta u odnosu na jaja koja su kupljena u trgovačkom centru ili obiteljskom gospodarstvu.

## 6. POPIS LITERATURE

- [1] M. A. El-Raey, G. E. Ibrahim, O. A. Eldahshan, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2013), 245-254.
- [2] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/79766> (1.7.2021.)
- [3] S. Liaaen-Jensen, *Basic Carotenoid Chemistry, Carotenoids in Health and Disease* ( N. I. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies), Maecel Dekker, Inc., New York, 2004, 1-31.
- [4] <https://alchetron.com/Isoprene> (2.7.2021.)
- [5] L. Feltl, V. Pacakova, K. Stulik, K. Volka, *Curr. Anal. Chem.*, 1 (2005), 93-102.
- [6] I. Jang, Y. Ko, S. Kim, M. Song, K. Cho, J. Ham, S. Sohn, *J. Polut. Sci.*, 51 (2014.), 58-65.
- [7] A. V. Rao, L. G. Rao, *Pharmacol. Res.*, 55 (2007), 207-216.
- [8] C. I. Cazzonelli, B. J. Pogson, *Trends Plant Sci.*, 15 (2010), 266-274.
- [9] J. Hirschberg, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4 (2001), 210-218.
- [10] G. Diretto, R. Tavazza *i sur.*, *BCM Plant Biology*, 13 (2006), 1-11.
- [11] E. Reboul, *Nutrients*, 5 (2013), 3563-3581.
- [12] K. J. Yeum, R. M. Russell, *Annu. Rev. Nutr.*, 22(2002),483-504.
- [13] W. Stahl, H. Sies, *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (2003), 345-351.
- [14] P. Palozza, *Nutr. Rev.*, 56 (1998), 257-265.
- [15] J. T. Landrum, R. A. Bone, *Arch. Biochem. Biophys.*, 385 (2001), 28-40.
- [16] [https://www.researchgate.net/figure/Differences-in-Structure-of-Lutein-and-Zeaxanthin-Adapted-from-Abdel-Aal-et-al-49\\_fig8\\_303347107](https://www.researchgate.net/figure/Differences-in-Structure-of-Lutein-and-Zeaxanthin-Adapted-from-Abdel-Aal-et-al-49_fig8_303347107) (6.7.2021.)
- [17] Z. Sun, T. Li, Z. Zhou, Y. Jiang, *Microalgae as a Source of Lutein: Chemistry, Biosynthesis, and Carotenogenesis, Microalgae Biotechnology* (C. Posten, S. F. Chen), Springer, Hannover, 2015, 37-58.

- [18] F. Weigel, J. Weiss, E. A. Decker, D. J. McClements, *Food Chem.*, 242 (2018.), 395-403.
- [19] A. C. Boileau, J. W. Erdman, Jr., *Impact of Food Processing on Content and Bioavailability of Carotenoids, Carotenoids in Health and Disease* ( N. I. Krinsky, S. T. Mayne, H. Sies), Maecel Dekker, Inc., New York, 2004, 209-228.
- [20] S. H. G. Adabi, M. A. Kamali, J. Davoudi, R. G. Cooper, A. Hajbabaei, *Arch. Geflügelk.*, 74 (2010), 158-163.
- [21] M. Srđić, *Procjena unosa luteina i zeaksantina u studentskoj populaciji*, Završni rad, sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, 2017, 7-14.
- [22] F. Granada, B. Olmedilla, I. Blanco, *Brit. J. Nutr.*, 90 (2003), 487-502.
- [23] <https://sites.google.com/site/organvidaoko/home/grad-oka> (7.7.2021.)
- [24] P. Palombo, G. Fabrizi, V. Ruocco, E. Ruocco, J. Fluhr, R. Roberts, P. Morganati, *Skin Pharmacol. Physiol*, 20 (2007), 199-210.
- [25] R. K. Saini, Y. Keum, *Food Chem.*, 240 (2018.), 90-103.
- [26] K. Zaheer, *J. Food*, 15 (2017), 474-487.
- [27] N. Furusawa, *Food Chem.*, 124 (2011), 1643-1646.
- [28] J. Schlatterer, D. E. Breithaupt, *J. Agr. Food Chem.*, 54 (2006.), 2267-2273.
- [29] X. Yue, Z. Xu, W. Prinyawiwatkul, J. M. King, *J. Food Sci.*, 71 (2006), 239-241.
- [30] J. Lin, D. Lee, J. Chang, *Bioresource Technology*, 1 (2014), 1-8.
- [31] H. Jin, F. Xia, C. Jiang, Y. Zhao, L. He, *Chin. J. Chem. Eng.*, 17 (2009), 672-677.
- [32] E. Y. Chew i sur., *JAMA Ophthalmol.*, 132 (2014), 142-149.
- [33] <https://www.hielscher.com/ultrasonic-extraction-and-its-working-principle.htm>  
(9.7.2021.)
- [34] H. Drmić, A. R. Jambrak, *Croat. J. Food Sci. Technol.*, 2 (2010), 22-33.

[35] I. Pacheco- Fernández, V. Pino, Liquid- Phase Extraction ( C. F. Poole), Elsevier Inc., Nizozemska ,2020, 499-537.

[36]<https://www.indiamart.com/proddetail/probe-sonicator-with-sound-proof-enclosure-500-w-16892428997.html> (11.7.2021.)

[37] A. Weston, P. R. Brown, HPLC and CE, Principles and Practice, Academic Press, San Diego, 1997.

[38] [http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (11.7.2021.)

[39] M. W. Dong, Modern HPLC for Practicing Scientists, Wiley-Interscience, Massachusetts, 2006.

[40][https://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US) (12.7.2021.)

[41] A. Hlušička, Predobrada bunarske vode bogate huminskim tvarima pomoću ozona, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje, 2016, 5-7.

[42] M. Mihoci, Čapopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske, 64 (2015.), 683-685.

[43] S. Leeson, L. Caston, Poultry Science, 83 (2004), 1709-1712.

[44] M. Roe, H. Pinchen, S. Church, P. Finglas, Nutrient analysis of eggs, Department of Health, London (2013)

## 7. ŽIVOTOPIS

Jela Ćosić

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Sveučilišni diplomski studij, istraživački smjer

Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek

Osobni podaci:

Adresa: Josipa Pleše 1, 35000 Slavonski Brod

e-mail adresa: [jela.cosic97@gmail.com](mailto:jela.cosic97@gmail.com)

Telefon: 0976493778

Datum i mjesto rođenja: 13. 11. 1997., Slavonski Brod

Obrazovanje:

2019.-2021. Sveučilišni 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. Gimnazija „Matija Mesić“ Slavonski Brod, smjer: Opća gimnazija

2004-2012. Osnovna škola Bogoslav Šulek, Slavonski Brod

Ostale aktivnosti:

2019. Sudjelovanje na Smotri Sveučilišta J. J. Strossmayera

2020. Sudjelovanje na MasKEMbalu i doprinos u promociji Odjela za kemiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku