



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ida Hećimović

**OPTIMIZACIJA PRIPREME UZORAKA
DJEČJE HRANE ZA ODREĐIVANJE
VITAMINA TOPIVIH U MASTIMA HPLC
TEHNIKOM**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ pod mentorstvom dr. sc. Jasne Bošnjir, zn. savj. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Jasni Bošnjir, zn. savj. na pruženoj mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ te na pristupačnosti i ukazanoj ljubaznosti.

Hvala dr. sc. Martini Bevardi na izdvojenom vremenu i vodstvu kroz ovaj rad.

Zahvaljujem se cijelom timu Laboratorija za tekućinsku kromatografiju i spektrometriju masa NZJZ „Dr. Andrija Štampar“ na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada, ugodnoj radnoj atmosferi, susretljivosti, savjetima i strpljenju (posebno hvala Vladimiri).

Hvala mentorici s fakulteta, prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na dostupnošću za konzultacije i savjet u svakom trenutku.

Veliko hvala mojoj široj obitelji i prijateljima na podršci i ohrabriranju tijekom izrade ovog rada.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima i braći na bezgraničnoj vjeri, ljubavi i razumijevanju koju mi pružate uvijek i svugdje.

Ida

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Vitamini.....	2
2.1.1. <i>Vitamini topivi u mastima</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Funkcije vitamina topivih u mastima u ljudskom tijelu.....</i>	<i>6</i>
2.1.3. <i>Vitamini topivi u mastima u dječjoj hrani.....</i>	<i>9</i>
2.2. Tehnike određivanja vitamina topivih u mastima u hrani.....	10
2.2.1. <i>Postupci priprema uzoraka hrane za analizu vitamina topivih u mastima.....</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....</i>	<i>14</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali i kemikalije	16
3.2. Korišteni instrumenti.....	16
3.3. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu	17
3.3.1. <i>Priprema uzoraka 1</i>	<i>17</i>
3.3.2. <i>Priprema uzoraka 2</i>	<i>18</i>
3.3.3. <i>Priprema uzoraka 3</i>	<i>18</i>
3.3.4. <i>Priprema uzoraka 4</i>	<i>18</i>
3.3.5. <i>Priprema uzoraka 5</i>	<i>19</i>
3.3.6. <i>Priprema uzoraka 6</i>	<i>19</i>
3.3.7. <i>Priprema uzoraka 7</i>	<i>20</i>
3.4. Kromatografski uvjeti	20
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Maseni udio vitamina u analiziranim uzorcima dječje hrane korištenjem HPLC tehnike.....	22
4.2. Deklarirani maseni udio vitamina u analiziranim uzorcima dječje hrane	23
4.3. Usporedba dobivenih rezultata s deklariranim vrijednostima	25
4.3.1. <i>Usporedba rezultata za vitamin A.....</i>	<i>25</i>
4.3.2. <i>Usporedba rezultata za vitamin D</i>	<i>29</i>
4.3.3. <i>Usporedba rezultata za vitamin E.....</i>	<i>32</i>
4.3.4. <i>Usporedba rezultata za vitamin K.....</i>	<i>35</i>
4.4. Usporedba rezultata analize s literaturnim podacima.....	37

§ 5. ZAKLJUČAK	41
§ 6. LITERATURNI IZVORI.....	XLIX
§ 7. ŽIVOTOPIS	LII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

OPTIMIZACIJA PRIPREME UZORAKA DJEČJE HRANE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA TOPIVIH U MASTIMA HPLC TEHNIKOM

Ida Hećimović

Analiza vitamina u dječjoj hrani izazovan je zadatak s obzirom na složenost matrice hrane, stabilnost vitamina i strogih propisa Europske unije o dopuštenim odstupanjima na deklaraciju hrane. Vitamini u hrani nalaze se u različitim koncentracijama i oblicima, različite su stabilnosti te nije jednostavno istim postupkom pripremiti uzorke za pouzdanu analizu. Stoga je u ovom radu pozornost usmjerena na odabir optimalnog načina pripreme uzoraka dječje hrane u svrhu simultane analize vitamina topljivih u mastima (A, D, E i K). Istraživanje je provedeno na četiri različita uzorka dječje hrane, a svaki od njih pripreman je na sedam načina pripreme koji se temelje na četiri postupka (saponifikacija, enzimska hidroliza, ekstrakcija otapalom i ekstrakcija na čvrstoj fazi). Za identifikaciju i kvantifikaciju analiziranih vitamina korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Najboljom pripremom pokazala se priprema temeljena na ekstrakciji na čvrstoj fazi sa C18 nepokretnom fazom.

(52 stranica, 10 slika, 11 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: dječja hrana, HPLC, priprema uzoraka, vitamini

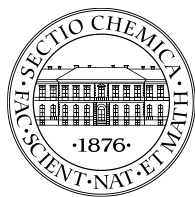
Mentor: dr. sc. Jasna Bošnjir, zn. savj.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. doc. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 16. rujna 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR DETERMINATION OF FAT-SOLUBLE VITAMINS IN INFANT FOOD BY HPLC TECHNIQUE

Ida Hećimović

Vitamins analysis in infant food is a challenging task due to many factors. These factors include: the complexity of the matrices, the stability of the vitamins and the rigorous regulations of the European Union (tolerance for the nutrition declaration on foods). Vitamins in food are found in different concentrations, structures and have different stability conditions so it isn't simple to prepare samples for reliable analysis using only one method. Hence, in this thesis, a special attention is devoted to choosing optimal sample preparation of infant food for simultaneous fat-soluble vitamins (A, D, E and K) analysis. The research was conducted on four different infant food samples. Each of the aforementioned samples of infant food was prepared in seven different ways which are based on four principles (saponification, enzymatic hydrolysis, solvent extraction and solid-phase extraction). High-performance liquid chromatography was used for the identification and quantification of the analysed vitamins. The best preparation was the one based on solid-phase extraction on C18 column.

(52 pages, 10 figures, 11 tables, 58 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: HPLC, infant food, sample preparation procedure, vitamins

Mentor: Dr. Jasna Bošnjir, Senior Scientist

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Professor
 3. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 16th September 2022.

§ 1. UVOD

Vitamini su esencijalne tvari neophodne za normalno funkcioniranje organizma. Omogućuju odvijanje brojnih enzimskih i metaboličkih funkcija u tijelu. Dijele se u dvije skupine, ovisno o njihovoj topivosti: vitamini A, D, E i K topivi su u mastima, dok su vitamin C i vitamini kompleksa B topivi u vodi.¹

Većina vitamina ne može se sintetizirati u tijelu te se stoga unose prehranom. Potrebni su u malim količinama (μg ili mg), ali njihov nedostatak ili prekomjeren unos može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme, posebice kod osjetljivih dobnih skupina. Stoga, dojenčad i djeca, kao najosjetljivija skupina, moraju imati uravnoteženu prehranu koja će im osigurati potrebne količine vitamina koji su neophodni za njihov pravilan rast i razvoj. Nadalje, od velike je važnosti imati pouzdanu analitičku metodu određivanja koncentracije vitamina u uzorcima dječje hrane.²

Analiza vitamina u dječjoj hrani zahtjevan je postupak s obzirom na kompleksnost sadržaja hrane, stabilnost vitamina i strogih propisa Europske unije o dopuštenim odstupanjima na deklaraciju hrane. Do danas, najčešće korištena tehnika za kvantitativno određivanje vitamina u uzorcima hrane je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Međutim, vitamini u hrani nalaze se u različitim koncentracijama i oblicima, različite su stabilnosti te nije uvijek jednostavno istim postupkom pripremiti uzorke za kromatografsku analizu. Stoga je u zadnjih par godina posvećena pozornost optimizaciji pripreme uzoraka u analizi vitamina.³

Cilj ovog rada je odrediti optimalnu pripremu uzoraka dječje hrane za simultanu analizu vitamina topivih u mastima (A, D, E i K) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Četiri različita uzorka dječje hrane (mlijeko za dojenčad, čokolino, suha i tekuća kašica) pripremljeno je na sedam načina pripreme koji se temelje na četiri postupka, a to su saponifikacija, enzimska hidroliza, ekstrakcija otapalom i ekstrakcija na čvrstoj fazi. Optimalna priprema uzoraka odredit će se usporedbom dobivenih i deklariranih vrijednosti sukladno vodiču Europske unije broj 1169/2011 te preko dva definirana kriterija.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vitamini

Pojam „vitamin“ (lat. *vita* – život) potječe iz 1912. godine kada je poljski biokemičar Kazimir Funk izolirao tiamin (vitamin B1) iz zrna smeđe riže. Smatrao je da izolirani spoj može pomoći u liječenju niza kardiovaskularnih bolesti te ga je nazvao životno važnim aminom, tj. vita–aminom. Iako je do danas otkriveno još vitamina koje nemaju aminsku vezu u svojim strukturama, naziv vitamin se zadržao.⁴

Kroz godine definicija vitamina se mijenjala, ali danas se najčešće nailazi na objašnjenje da su vitamini skupina organskih spojeva raznovrsnih struktura i kemijskih svojstava koji su neophodni za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Razlikuju se od drugih hranjivih tvari (lipida, ugljikohidrata, proteina) po tome što nemaju strukturnu ulogu niti ne stvaraju energiju, ali sudjeluju u nizu metaboličkih procesa kao antioksidansi, regulatori ili koenzimi.⁵

Većina vitamina unosi se hranom s obzirom da ih ljudsko tijelo ne može samo proizvesti (iznimke su vitamini D i K). Spadaju u skupinu mikronutrijenata jer su dnevne potrebe za vitaminima između 1 µg i 100 mg.⁶

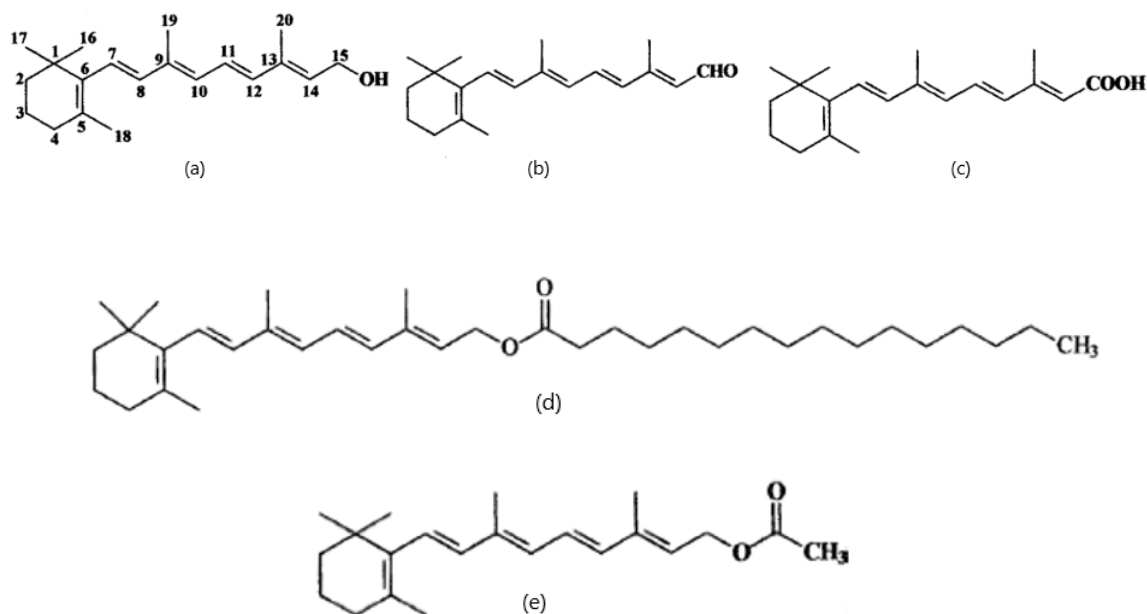
Vitamini su se u prošlosti svrstavali u grupe na temelju njihovih funkcija u tijelu, ali danas se dijele u dvije grupe s obzirom na topivost: na vitamine topive u mastima (A, D, E i K) te vitamine topive u vodi (vitamin C i vitamini kompleksa B).

U sljedećim pododjeljcima opisani su vitamini topivi u mastima, njihove kemijske strukture i svojstva (2.1.1.), njihove funkcije u ljudskom tijelu (2.1.2.) te njihove strukture u uzorcima dječje hrane (2.1.3.).

2.1.1. Vitamini topivi u mastima

Kemijski sastav vitamina određuje njihovu topivost u različitim medijima. Vitamini topivi u vodi sadrže atome ugljika, vodika, kisika, dušika, sumpora i kobalta (osim vitamina C), dok vitamini topivi u mastima sadrže isključivo atome ugljika, vodika i kisika.

Vitamin A, poznat još pod nazivom retinol, spada u skupinu retinoida, spojeva čija se osnovna struktura sastoji od tri dijela: trimetiliranog cikloheksanskog prstena, polienskog bočnog lanca te polarne funkcijske skupine na terminalnom C atomu. Krajnja funkcijska skupina može biti hidroksilna (retinol), aldehidna (retinal), karboksilna (retinoična kiselina) i esterska (retinil–ester) (slika 1). Retinol i njegovi esteri (acetat i palmitat) imaju najizraženije vitaminsko djelovanje.



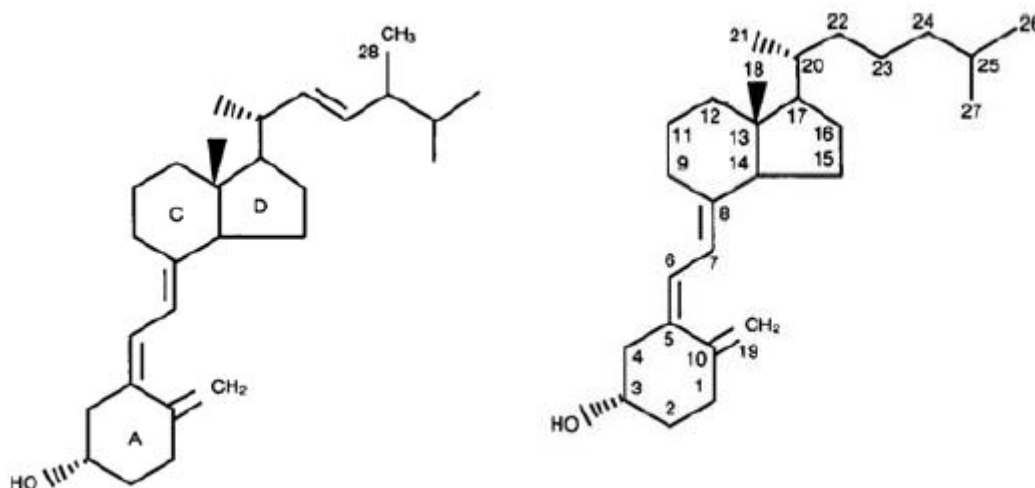
Slika 1. Najčešće strukture retinoida: retinol (a), retinal (b), retinoična kiselina (c); retinil–palmitat (d); retinil–acetat (e).⁷

Iz struktura retinoida proizlazi da su one pretežito hidrofobne molekule pa su netopive u vodi, dok su u organskim otapalima (masti, ulja, heksan, dietil–eter, aceton, kloroform, etanol, metanol) topive.

Zbog konjugiranih dvostrukih veza u lancu, retinoidi su nestabilni u prisustvu svjetla, oksidansa i topline pri čemu može doći do oksidacije ili izomerizacije. Upravo je konjugirani polienski lanac zaslužan za snažno apsorpiranje UV–Vis zračenja (325 – 380 nm).

Od sredine 1970–ih godina do danas, analitička metoda za određivanje vitamina A u složenim matricama poput krvnog seruma i hrane je HPLC s UV–Vis detektorom ili vezani sustav LC–MS. Također, retinoide je moguće odrediti i spektrofotometrijskim metodama.⁸

Vitamin D naziv je za skupinu sekosteroida, podvrstu steroida u kojima je jedna veza u steroidnom prstenu B „slomljena“. Postoji sedam vrsta vitamina D, ali samo dva su biološki aktivna: vitamin D2 ili ergokalciferol i vitamin D3 ili kolekalciferol. Strukturno se razlikuju samo na dva mjesta na bočnom lancu; vitamin D2 ima dvostruku vezu na C–22 atomu i ima dodatnu metilnu skupinu na C–24 atomu, što vitamin D3 nema (slika 2).⁹

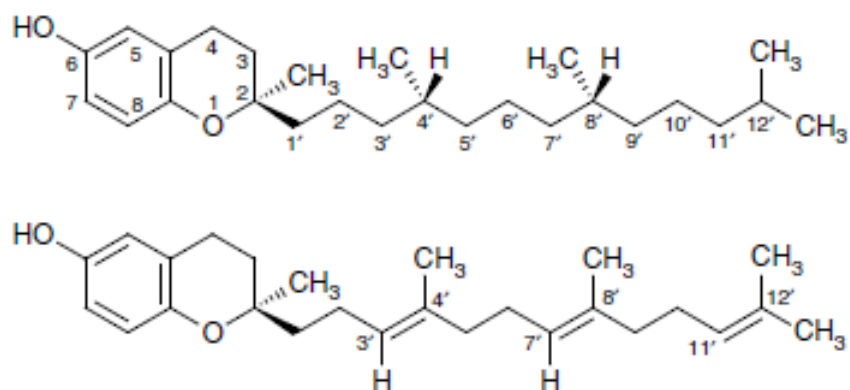


Slika 2. Strukture aktivnih oblika vitamina D; vitamin D2, ergokalciferol (lijevo) i vitamin D3, kolekalciferol (desno).¹⁰

Vitamini D2 i D3 netopivi su u vodi, ali topivi su u većini organskih otapala: etanolu, acetonu, kloroformu itd. Nestabilni su na svjetlu i zraku. U lužnatim uvjetima su stabilni, dok su u kiselim uvjetima nestabilni; u mediju već blage kiselosti izomeriziraju u 5,6-*trans* izomer vitamina D i izotahisterol.¹¹

Najčešća tehnika za određivanje vitamina D2 i D3 je HPLC s UV-Vis detektorom ($\lambda = 265$ nm).

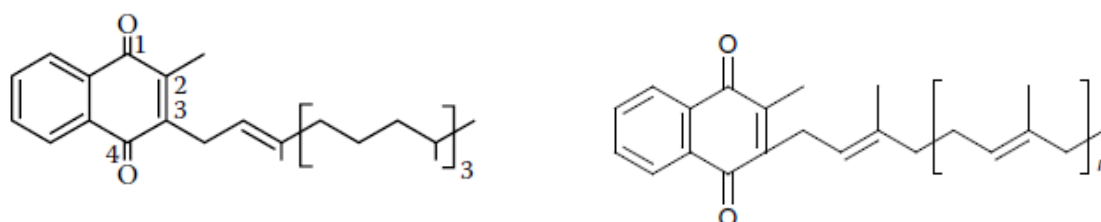
Vitamin E naziv je za skupinu tokokromanola, skupinu spojeva čija se struktura sastoji od kromanolnog prstena na koji su vezane jedna do tri metilne skupine i izoprenoidni lanac od 16 ugljikovih atoma. S obzirom na zasićenost veza ugljikovodičnog lanca, tokokromanoli se dijele na tokoferole (zasićene veze) i tokotrienole (nezasićene veze) (slika 3). U prirodi postoji četiri tokoferola i četiri tokotrienola, a označuju se kao α , β , γ i δ – spojevi, prema broju i položaju metilnih skupina na prstenu. α -Tokoferol (5,7,8-trimetil tokoferol) je biološki najaktivniji oblik vitamina E.

Slika 3. Struktura tokoferola (gore) i tokotrienola (dolje).¹²

Tokoferoli i tokotrienoli topivi su u organskim otapalima, a netopivi u vodi. Nestabilni su na svjetlu i lako se oksidiraju na zraku pri čemu nastaju biološki neaktivni kinoni. Stabilni su na povišenoj temperaturi i u kiselim i lužnatim uvjetima u odsustvu kisika i svjetlosti.¹³

Kao i kod vitamina A i D, najučestalija metoda određivanja vitamina E je HPLC s UV–Vis detektorom ($\lambda = 292 - 296 \text{ nm}$), ali nekad se koriste i spektrofotometrijske metode, Ramanova i IR spektroskopija te radioimunokemijsko određivanje.¹⁴

Vitamin K označava skupinu od nekoliko vitamina čija se osnovna struktura sastoji od naftokinonskog prstena koji je na položaju C–2 atoma supstituiran metilnom skupinom, a na položaju C–3 supstituiran zasićenim/nezasićenim ugljikovodičnim lancem. U prirodi postoje dva aktivna oblika vitamina K: filokinon ili vitamin K1 i menakinoni ili vitamin K2. Menakinoni su skupina strukturnih analoga koji mogu sadržavati 6 – 10 nezasićenih izoprenoidnih jedinica (slika 4).

Slika 4. Strukture aktivnih oblika vitamina K; vitamin K1, filokinon (lijevo) i vitamin K2, menakinon (desno).¹⁵

Filokinon je netopiv u vodi, slabo je topiv u etanolu, a lako je topiv u uljima, mastima i ostalim nepolarnim otapalima.

Spojevi vitamina K vrlo su nestabilni u bazičnim i kiselim medijima te se razgrađuju pod vidljivim i ultraljubičastim svjetlom. Međutim, stabilni su na povišenoj temperaturi i, za razliku od prethodnih vitamina, stabilni su na zraku.

Od 1980-ih godina, glavna metoda određivanja vitamina K u uzorcima hrane je HPLC s UV-Vis detektorom zbog sposobnosti naftokinonskog prstena da apsorbira UV zračenje između 240 i 280 nm i 320 i 330 nm.¹⁶

Sumirajući gore navedeno, vitamini topivi u mastima (A, D, E i K) imaju zajednička svojstva:

- topivosti u organskim otapalima i netopivosti u vodi,
- fotoosjetljivosti – svi vitamini se razgrađuju na svjetlu,
- oksidacije na zraku (osim vitamina K),
- apsorpcije UV-Vis zračenja.

Vitamini A i E stabilni su i u kiselom i u lužnatom mediju, vitamin D je nestabilan u kiselim uvjetima, a stabilan u lužnatom okruženju, dok vitamin K nije stabilan ni u lužnatim ni u kiselim medijima.⁴⁵

2.1.2. Funkcije vitamina topivih u mastima u ljudskom tijelu

Vitamini su tvari neophodne za život, iako nisu izvor energije kao makronutrijenti (proteini, masti i ugljikohidrati). Omogućuju odvijanje brojnih enzimskih i metaboličkih funkcija u tijelu. Potrebni su u malim količinama (μg ili mg), ali njihov nedostatak ili prekomjeren unos može izazvati ozbiljne zdravstvene probleme.

U ovom poglavlju opisane su glavne uloge vitamina topivih u mastima u ljudskom tijelu te mogući zdravstveni problemi koji mogu nastati nedovoljnim unosom vitamina.

Glavna uloga vitamina A u organizmu vezana je za vid. Vitamin A sudjeluje u sintezi rodopsina, vidnog pigmenta mrežnice, koji ima ključnu ulogu u prilagodbi oka na svjetlo. Retinol u očnom tkivu oksidira se u retinal koji se izomerizira u 11-*cis*-retinal te se prenosi u štapićaste stanice u zjenici oka. Tamo se veže na protein opsin tvoreći vidni pigment

rodopsin. Štapićaste stanice s rodopsinom mogu detektirati vrlo male količine svjetlosti, što je važno za vid po noći. Brzina kojom se rodopsin stvara ovisna je o dostupnosti retinola. Slabljenje vida u sumrak (tzv. noćno sljepilo) glavni je indikator da u organizmu nedostaje vitamina A.¹⁷

Također, vitamin A važan je za rast i razvoj stanica, pri čemu je od velike važnosti za djecu i adolescente. Sudjeluje u razvoju imunološkog sustava, uključen je u održavanje stanica specifične imunosti, limfocita B i T te sudjeluje u procesu eritropoeze.

Kako bi se izbjegle zdravstvene tegobe uzorkovane nedostatkom ili prekomjernim unosom vitamina, propisani su dnevni unosi (engl. *Recommended Dietary Allowance*, RDA) svakog vitamina za određenu dob.

U tablici 1 navedene su vrijednosti preporučenih dnevnih unosa vitamina A za dojenčad i djecu.

Tablica 1. Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina A za dojenčad i djecu.¹⁸

SKUPINA	DOB	RDA / μg
DOJENČAD	0 – 6 mj.	400
	7 – 12 mj.	500
DJECA	1 – 3 g.	300
	4 – 8 g.	400
	9 – 13 g.	600

Vitamin D ključan je u metabolizmu kalcija potrebnog za izgradnju kostiju i zuba. Prednost vitamina D, tj. vitamina D₃ (kolekalciferola) je ta što se može sintetizirati u ljudskom organizmu pomoću UV sunčevih zraka. Iz kolesterola, preko niza reakcija nastaje 7–dehidrokolesterol (provitamin D₃) na kojem, tijekom izlaganja suncu, dolazi do cijepanja B prstena, okretanja molekule i nastanka kolekalciferola. Međutim, njegovo razlaganje je brzo, što znači da se zalihe brzo troše, naročito preko zimskih mjeseci. S druge strane, dojenčad i djecu, kao najosjetljiviju skupinu, nije dobro duže izlagati suncu.¹⁹

Dokazano je da nedostatak vitamina D u djetinjstvu uzrokuje slabiju gustoću kostiju i rahitis, bolest karakteriziranu nedovoljnom kalcifikacijom hrskavice i kostiju. Kao posljedica rahitisa nastaju deformacije kostura („O“ noge, „X“ noge, deformacije zdjelice, prsnog koša, sklonost lomovima kostiju).¹⁹ Kod odraslih, pomanjkanje vitamina D izaziva osteoporezu i

osteomalaciju, proces gubitka koštane mase. Kako bi se navedeni problemi izbjegli, dobro je znati preporučene dnevne unosa (RDA) vitamina D (tablica 2).

Tablica 2. Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina D za dojenčad i djecu.²⁰

SKUPINA	DOB	RDA / μg
DOJENČAD	0 – 12 mj.	10
DJECA	1 – 13 g.	15

Važno je napomenuti i druge uloge vitamina D, a to su da sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, regulira rast stanica kože, bitan je za aktivaciju limfocita T i B te, prema posljednjim istraživanjima, sudjeluje u metabolizmu inzulina.

Osnovna funkcija vitamina E u tijelu je da djeluje kao antioksidans, pri čemu štetne radikale nastale tijekom metaboličkih procesa reducira u neškodljive oblike. Polinezasićene masne kiseline staničnih membrana izrazito su osjetljive na oštećenja radikalima. Reakcijom radikala i polinezasićene masne kiseline nastaje lipoperoksil–slobodni radikal, koji može napasti susjednu polinezasićenu masnu kiselinu i tako započeti štetnu lančanu reakciju po membransku strukturu. Zahvaljujući hidroksilnoj skupini na prstenu tokoferola (slika 3) koja može otpustiti vodikov atom i njime reducirati radikal masne kiseline, vitamin E sprječava daljnja oštećenja staničnih membrana.²¹

Nedostatak vitamina E ili hipovitaminoza E u tijelu dovodi do oštećenja i razgradnje staničnih struktura. Na sreću, deficit vitamina E je rijedak kod djece i odraslih, međutim kod nedonoščadi može izazvati zdravstvene probleme poput hemolitičke anemije, mišićne slabosti i neuroloških poteškoća uzrokovanih lošom provodljivošću živaca.²²

U tablici 3 nalaze se preporučene dnevne doze unosa (RDA) vitamina E kod dojenčadi i djece.

Tablica 3. Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina E za dojenčad i djecu.²³

SKUPINA	DOB	RDA / mg
DOJENČAD	0 – 6 mj.	4
	7 – 12 mj.	5
DJECA	1 – 3 g.	6
	4 – 8 g.	7
	9 – 13 g.	11

Vitamin K nazvan je vitaminom K jer njegov nedostatak izaziva poremećaj u koagulaciji (zgrušavanju) krvi. Glavna funkcija vitamina K je da aktivira koagulacijske faktore: protrombin – faktor II i faktore VII, IX, X. Navedeni faktori sintetiziraju se u jetri, u svojoj strukturi sadrže glutamatne ostatke i aktiviraju se procesom karboksilacije pri čemu nastaje γ -karboksilglutamat. Dobiveni karboksilirani faktori „lijepe“ se na površinu ranjenog tkiva i sprječavaju gubitak krvi pri oštećenju krvnih žila. Bez vitamina K karboksilacija se ne može dogoditi te posljedično nastaju nepravilnosti tokom koagulacije.²⁴

Manjak vitamina K u pravilu je rijetkost kod odraslih osoba, s obzirom da ga mogu sintetizirati crijevne bakterije.²⁵ Međutim, kod novorođenčeta deficit vitamina K može razviti hemoragijsku bolest, prijelaznu pojavu koja se javlja jer jetra novorođenčeta nije dovoljno „zrela“ da bi stvarala dovoljnu količinu koagulacijskih faktora, crijevo nije naseljeno bakterijama koje stvaraju vitamin K, a majčino mlijeko ne sadrži dovoljne količine navedenog vitamina.²⁶ Kako bi se izbjegli zdravstveni problemi prouzročeni nedostatkom vitamina K u male djece, vitamin K jedan je od glavnih sastojaka prijelazne mliječne hrane za novorođenčad.

U tablici 4 nalaze se preporučene dnevne doze unosa (RDA) vitamina K kod dojenčadi i djece.

Tablica 4. Preporučeni dnevni unos (RDA) vitamina K za dojenčad i djecu.²⁷

SKUPINA	DOB	RDA / μg
DOJENČAD	0 – 6 mj.	2
	7 – 12 mj.	2,5
DJECA	1 – 3 g.	30
	4 – 8 g.	55
	9 – 13 g.	60

2.1.3. Vitamini topivi u mastima u dječjoj hrani

Vitamin A, D, E i K topivi su u mastima te se apsorbiraju u tijelu ukoliko se konzumiraju zajedno s izvorom masti. Stoga, hrana koja sadrži vitamine topive u mastima većinski se sastoji od triglicerida i manjih količina fosfolipida i sterola. Također, u hrani, vitamini topivi u mastima vezani su za kompleks lipoproteina pa se pri pripremi uzoraka hrane za analizu vitamina trebaju koristiti reagensi koji mogu prekinuti veze masti i proteina kako bi se

promatrani vitamini oslobodili iz lipidne matrice. Tu funkciju često vrši etanol, kao i denaturaciju proteina.²⁸

Što se tiče struktura vitamina u uzorcima hrane, utvrđeno je sljedeće:

- vitamin A uglavnom se nalazi u svojim esterificiranim oblicima: retinil–acetatu i retinil–palmitatu,
- vitamin D nalazi se u svojim aktivnim oblicima: vitaminu D3 (kolekalciferol) i vitaminu D2 (ergokalciferol)
- vitamin E većinski se nalazi u formi estera: α –tokoferil acetata, a
- kod analize vitamina K određuje se samo vitamin K1 (filokinon).^{28–29}

2.2. Tehnike određivanja vitamina topivih u mastima u hrani

Analiza sastojaka u hrani izazovan je zadatak s obzirom da se radi o vrlo složenoj matrici.

Hrana se sastoji od tvari koje tijelu daju energiju i koje su potrebne u velikim količinama za normalno funkcioniranje organizma (makronutrijenti – proteini, masti i ugljikohidrati), i od sastojaka koji su potrebni u malim količinama, ali su esencijalni za očuvanje zdravlja (mikronutrijenti – vitamini i minerali). Pri tome potrebno je obratiti veliku pozornost pri pripremi uzoraka za analizu kako bi se analit(i) uspješno izolirao(li) od interferirajuće matrice.

U analizi vitamina topivih u mastima postoji niz zapreka koji mogu prouzročiti netočne i nepouzdanе rezultate analize. Vitamini topivi u mastima pojavljuju se u tragovima, kemijski su vezani za kompleks lipoproteina, fotoosjetljivi su, oksidiraju se na zraku (osim vitamina K) i nemaju svi istu stabilnost u kiselinama i lužinama. Priprema uzoraka mora osigurati da se vitamini kvantitativno ekstrahiraju iz matrice u obliku koji se točno može izmjeriti izabranom analitičkom metodom.

U sljedećim pododjeljcima opisani su, do sad, poznati postupci pripreme uzoraka za analizu vitamina topivih u mastima u hrani (2.2.1.) te najčešće korištena analitička metoda za određivanje istih – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (2.2.2.).

2.2.1. Postupci priprema uzoraka hrane za analizu vitamina topivih u mastima

Najčešći postupci pripreme uzoraka hrane za analizu vitamina topivih u mastima su: saponifikacija (alkalna hidroliza), enzimska hidroliza, ekstrakcija otapalom (ekstrakcija tekuće–tekuće) i ekstrakcija na čvrstoj fazi.^{30–45}

Saponifikacija (alkalna hidroliza) najčešći je postupak pripreme uzoraka za analizu vitamina A, D i E. Radi se o hidrolizi estera viših masnih kiselina vrućom lužinom pri čemu nastaju alkoholne forme i soli masnih kiselina, tzv. sapuni. Provodi se polusatnim zagrijavanjem uzorka u smjesi etanola i 60%-tne vodene otopine kalijeva hidroksida u prisutnosti antioksidansa (askorbinske kiseline ili butilhidroksitoluena, BHT) koji sprječava oksidaciju analita. Također, reakcijski sustav s uzorkom zaštićen je od svjetla tijekom cijelog postupka kako ne bi došlo do razgradnje analita. Prilikom reakcije hidrolize kidaju se esterske veze interferirajućih tvari u matrici hrane, oslobađaju se vitamini iz lipoproteinskog kompleksa i esteri vitamina A i E prelaze u svoje alkoholne forme. Nakon brzog hlađenja, „oslobođeni“ vitamini ekstrahiraju se organskim otapalom koji se ne miješa s vodom, a u kojem su vitamini topivi, dok interferirajuće tvari (sapuni, glicerol) nisu. Potom se organski sloj upari u struji dušika i upareni ekstrakt se otopi u malom volumenu otapala prikladnom za daljnju analizu.^{31,33,45} Vitamin K razgrađuje se u lužnatom mediju te saponifikacija nije prikladna pripremna metoda za njegovo određivanje.

Enzimaska hidroliza nedestruktivna je alternativa saponifikaciji za uklanjanje masnoća iz matrice hrane pri čemu se simultano mogu analizirati sva četiri vitamina s obzirom da se ne koristi lužina koja razara vitamin K. Umjesto lužine, ovdje enzim (najčešće lipaza) katalizira reakciju hidrolize estera više masnih kiselina i esterskih formi vitamina A i E. Razlika u odnosu na postupak saponifikacije je taj da se u sustav dodaje pufer kako bi održao optimalni pH raspon od 7,6 do 8,2, zagrijavanje traje dva sata uz stalno miješanje, a dodaje se etanol kako bi oslobodio vitamine iz lipidne frakcije i denaturirao proteine. Postupak ekstrakcije je isti pri čemu se vitamini uspješno izoliraju iz matrice.³³

Ekstrakcija otapalom (ekstrakcija tekuće–tekuće) analitički je postupak odvajanja tvari iz homogenih smjesa na osnovi različite topivosti u različitim otapalima koja se ne miješaju. Cilj ekstrakcije je dobiti koncentriran i izoliran analit, sa što manje interferencija iz matrice uzorka. Prijelaz tvari zbiva se na dodirnoj površini između tekućih faza. Što je dodirna površina veća, to je ekstrakcija uspješnija, a veća površina postiže se mućkanjem (na vibracijskoj miješalici – vorteksu, tresilici ili ultrazvučnoj kupelji). Ipak, učinkovitost ekstrakcije najviše ovisi o izboru otapala, a taj izbor ovisi o vrsti i svojstvima analita koji se želi ekstrahirati.

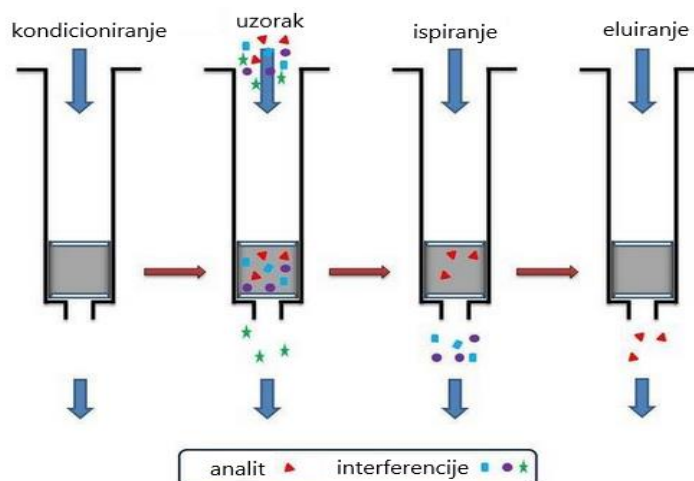
U praksi, jedno otapalo je obično voda, a drugo otapalo je organsko otapalo koje se ne miješa s vodom kako bi se uspostavio dvofazni sustav. Drugo otapalo ne smije kemijski reagirati s prisutnim tvarima i željeni analit u njemu treba biti više topiv nego u polaznom otapalu. Razlika u gustoći otapala treba biti što veća, a vrelište ne previsoko (60 – 90 °C) kako bi se otapalo lako uparilo. Uparivanje otapala je završna faza odvajanja analita ekstrakcijom, a izvodi se destilacijom ili uparivanjem pri normalnom ili sniženom tlaku.³⁴

Vitamini topivi u mastima mogu se ekstrahirati iz uzorka hrane bez kemijske promjene pomoću sustava otapala koji je sposoban razbiti lipoproteinske veze. Često se koristi smjesa metanola i kloroforma (1:2 v/v). Međutim, ekstrakcija otapalom zahtjeva korištenje velikih količina otapala, dosta kemijskog posuđa i uređaja (lijevak za odijeljivanje, uređaji za miješanje) te često stvara emulzije s vodenim uzorcima koje je teško ekstrahirati. Navedene poteškoće su se krajem prošlog stoljeća prevladale ekstrakcijom na čvrstoj fazi.³⁵

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) pročišćava i koncentrira analit od matrice uzorka na temelju selektivnog vezanja analita na sorbens (čvrstu fazu) smješten u kolonici, nakon čega slijedi eluiranje (ispiranje) analita odgovarajućim otapalom.

Kao čvrsta faza najčešće se koristi silikagel na koji se vežu funkcijske skupine različite polarosti o kojima kasnije ovisi mehanizam odvajanja analita od interferencija. Ukoliko su na silikagel vezane polarne funkcijske skupine (amino (–NH₂), cijano (–CN), diolne (–COHCOH)), na njih se vežu polarni analiti i tada se govori o mehanizmu normalnih faza (engl. *Normal Phase SPE*). U drugom slučaju, ako su na silikagel vezani nepolarni ugljikovodici (oktadecil (C18), oktil (C8), cikloheksil, fenil), na njih se vežu nepolarni analiti i tada se radi o mehanizmu obrnutih faza (engl. *Reversed Phase SPE*). Mehanizmi retencije analita na sorbens uključuju interakcije vodikovim vezama, dipol–dipol interakcije, π – π interakcije i inducirani dipol–dipol interakcije.³⁶

Ekstrakcija na čvrstoj fazi sastoji se od četiri koraka: kondicioniranja čvrste faze, nanošenja uzorka na sorbens, ispiranje interferencija sa sorbensa i eluiranja analita sa sorbensa (slika 5).

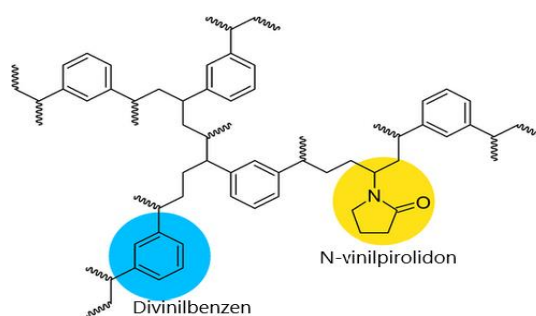
Slika 5. Postupak ekstrakcije na čvrstoj fazi.³⁷

Kondicioniranje podrazumijeva nanošenje otapala na sorbens kako bi se solubilizirale funkcijske skupine sorbensa, uklonio prisutan zrak u kolonici i popunio prazan prostor otapalom. Često otapalo za kondicioniranje je metanol nakon čega slijedi voda ili vodeni pufer. Zatim se uzorak nanosi na sorbens (koji ima veliki afinitet za analit i mali do nikakav za matricu) pri čemu se analit zadržava na sorbensu preko nekih od navedenih interakcija, a interferencije iz matrice prolaze kroz kolonicu. Ipak, neke komponente iz matrice mogu se zadržati na sorbensu, ali one se uklanjaju u trećem koraku otapalom koji će ih isprati, ali koje će također zadržati analit na sorbensu. U posljednjem koraku, analit se eluira (ispire se) sa sorbensa otapalom koje je dovoljno jako da prekine interakcije analita i funkcijskih skupina sorbensa. Prikupljeni eluat upari se u struji dušika te se otopi u malom volumenu otapala prikladnog za daljnju analizu.

Pri analizi vitamina topivih u mastima, reverzno-fazna ekstrakcija često se koristi za pročišćavanje analita od matrice uzorka. Sorbens koji se koristi već dugi niz godina je oktadecilsilan (ODS – C18 lanac vezan za silikagel), a eluirajuća otapala koja su sposobna prekinuti veze analita i C18 funkcijske skupine sorbensa su metanol, acetonitril i etil-acetat.³⁸

Osim što se vitamini A, D, E i K čvrsto vežu za oktadecilsilan preko nepolarnih interakcija, prednost navedenog sorbensa je to što zbog promjera svojih pora od 60 Å isključuje čestice velikih masa, poput proteina. Međutim, u reverzno-faznoj ekstrakciji organski polimeri počeli su se sve češće koristiti kao sorbensi zbog svojih višestrukih prednosti. Njihove strukture čine veću površinu za vezanje analita i omogućuju dulju sposobnost zadržavanja analita od C18 lanca. Također, polimernim sorbentima često su

nadodane hidrofilne skupine koje zadržavaju i polarne skupine; stabilni su pri ekstremnim pH vrijednostima i u širokom rasponu otapala. Polimerni sorbens koji se u zadnjih par godina često koristi u raznim analizama je tzv. HLB (engl. *Hydrophilic–Lipophilic–Balanced*) sorbens. Sastoji se od dva monomera: hidrofobnog divinilbenzena i hidrofilnog *N*-vinilpirolidona (slika 6). Hidrofobni dio polimera veže nepolarne skupine analita, dok hidrofilne skupine reagiraju s polarnim funkcijskim skupinama analita pri čemu se osigurava dulje zadržavanje analita na sorbensu što rezultira boljim rezultatima.³⁹



Slika 6. Struktura polimernog HLB sorbensa.⁴⁰

2.2.2. Reverzno-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija je od 1980-ih godina vodeća metoda za analizu vitamina u hrani. Međutim, prije pojave kromatografskih tehnika, vitamini su se određivali spektrofotometrijski, fluorimetrijski te mikrobiološkim testovima. Napretkom tehnologije razvijale su se brže, jednostavnije i točnije analitičke metode. Tako je danas tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti glavna analitička metoda za analizu vitamina u hrani, a u literaturi se sve češće spominje kapilarna elektroforeza.^{41, 45}

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci smjese raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Pokretna faza može biti tekućina (tekućinska kromatografija) ili plin (plinska kromatografija), dok je nepokretna faza najčešće krutina. Komponente uzorka koje se žele razdvojiti moraju biti topive u pokretnoj fazi, ali isto tako moraju na neki način djelovati s nepokretnom fazom. Posljedica toga je da se sastojci smjese različito raspodjeljuju između dvije faze prema određenim mehanizmima što je temelj za njihovo kromatografsko odvajanje.

Kromatografske metode mogu se podijeliti prema mehanizmu odvajanja komponenti smjese na razdjelnu, adsorpcijsku, ionsko–izmjenjivačku kromatografiju i kromatografiju isključenjem po veličini molekula, a dijele se i prema obliku kromatografske podloge na kolonsku (kromatografija na stupcu) i plošnu kromatografiju. Kromatografske kolone ispunjene su česticama punila (nepokretnom fazom) različitih promjera. Ukoliko je promjer čestica punila ~ 5 µm, tada se radi o tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), danas najviše korištene separacijske tehnike.

Pri analizi uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti važan je izbor pokretne faze, koja kod tehnike HPLC protječe kroz kolonu pri povišenom tlaku. Najčešće se koriste otapala ili smjesa otapala različite polarnosti čiji sastav se može mijenjati tijekom odjeljivanja sastojaka. Ukoliko je sastav pokretne faze tijekom ispiranja stalan, radi se o izokratnom eluiranju, a ukoliko se sastav pokretne faze mijenja, koristi se gradijentno eluiranje kojim se postižu uži pikovi te bolje razlučivanje spojeva.⁴²

Što se tiče detektora u tekućinskoj kromatografiji, koriste se detektori koji pretvaraju tok, koji sadrži pokretnu fazu i analizirani spoj, u električni signal proporcionalan koncentraciji analita. Najčešće se koriste UV–Vis detektori koji mjere apsorpciju zračenja spojeva koji sadrže kromofore (nezasićene organske skupine čije elektrone je moguće pobuditi UV–Vis zračenjem), fluorescencijski detektori, a u zadnje vrijeme sve češće se koristi spektrometar masa kao detektor zbog svoje selektivnosti i osjetljivosti.^{43,32,58}

Analiza vitamina u uzorcima hrane provodi se razdjelnom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Razdjelna kromatografija temelji se na različitoj topivosti sastojaka u pokretnoj i nepokretnoj fazi, a dijeli se na kromatografiju normalnih faza (nepokretna faza polarnija od pokretne) i kromatografiju obrnutih faza (pokretna faza polarnija od nepokretne). Za analizu vitamina topivih u mastima češće se koristi kromatografija obrnutih (reverznih) faza (engl. *Reversed–Phase Chromatography*, RP–HPLC) gdje nepolaran oktadecilsilan (ODS – C18 alkilne grupe vezane na silikagel) čini nepokretnu fazu, a smjesa metanola i acetonitrila čini polarnu pokretnu fazu. Manje polarne komponente dulje se zadržavaju na nepokretnoj fazi te se stoga eluiraju poslije polarnijih komponenti.^{44,45}

Prije unošenja uzoraka na kromatografsku kolonu potrebno je dobro ukloniti sve interferencije kako ne bi došlo do oštećenja na koloni i stvaranja poteškoća pri analizi pikova.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i kemikalije

- ultračista voda, električne provodljivosti $0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$
- klorovodična kiselina, HCl, p.a. čistoće, 37 %, *Merck*
- metanol, CH₃OH, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, *PanReac AppliChem*
- n–heksan, CH₃(CH₂)₄CH₃, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, *Sigma Aldrich*
- butilhidroksitoluen (BHT), C₁₅H₂₄O, *Merck*
- acetonitril (ACN), CH₃CN, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, *Sigma Aldrich*
- etanol, C₂H₅OH, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, *Scharlau*
- fosfatni pufer, KH₂PO₄, 0,8 M, pH = 8,0
- lipaza, tip VII, ≥ 700 jedinica mg⁻¹, *Sigma Aldrich*
- kalijev karbonat, K₂CO₃, p.a. čistoće, *Kemika d.d.*
- izopropanol (IPA), C₃H₈O, HPLC čistoće, $\geq 99,9$ %, *Thermo Fisher Scientific*
- etil–acetat, C₄H₈O₂, *Scharlau*
- limunska kiselina monohidrat, C₆H₈O₇ · H₂O, p.a. čistoće, *Gram–mol d.o.o.*
- kalijev hidroksid, KOH, *Merck*
- natrijev klorid, NaCl, p.a. čistoće, *Alkaloid*
- polietilenske kivete za centrifugu s čepom, 50 mL, *Kefo*®
- SPE HLB kolonica, 3 mL, 500 mg punjenja, *Oasis*®
- SPE C18 kolonica, 3 mL, 500 mg punjenja, *Macherey–Nagel*
- membranski filteri s promjerom pora 0,45 μm, *PALL Corporation*
- kromatografska kolona: *Phenomenex* 5 μm; C18 250 mm x 4,6 mm HPLC kolona

3.2. Korišteni instrumenti

Tijekom pripreme uzoraka za analizu korišteni su sljedeći uređaji i instrumenti: analitička vaga, ultrazvučna kupelj, vodena kupelj, tresilica, vibracijska miješalica (vorteks), centrifuga, vakuum sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi i uparivač u struji dušika. Za samu

kromatografsku analizu korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s UV–Vis detekcijom, model Agilent 1200 Series.

3.3. Priprema uzoraka za kromatografsku analizu

U ovom radu analizirana su četiri uzorka dječje hrane kupljena u jednom trgovačkom lancu:

- prijelazna mliječna hrana za dojenčad, proizvođač iz *EU*
- čokolino, proizvođač iz *HR*
- suha mliječna kašica (pet žitarica sa suhom šljivom), proizvođač iz *EU*
- tekuća mliječna kašica (s jabukom, kruškom i pšeničnom krupicom), proizvođač iz *EU*

Kupljeni uzorci premješteni su u male staklene posude i spremljeni su na suhom, hladnom i tamnom mjestu.

Svaki uzorak pripremljen je u triplikatu i to na sedam načina pripreme opisanih u narednim pododjeljcima.

Napomena: Sustav s uzorkom (u daljnjem tekstu kivetu za centrifugu) treba biti zaštićen od svjetla od početka do kraja pripreme uzorka!

3.3.1. Priprema uzoraka 1

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $2,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 10 mL ultračiste vode i 5 mL klorovodične kiseline ($c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$). Sadržaj se homogenizira na vibracijskoj miješalici pola minute te se stavi u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta na 37 °C. Nakon kupelji, u kivetu se doda 5 mL metanola i sadržaj se miješa na vibracijskoj miješalici pola minute. Zatim, uzorak se ekstrahira s 10 mL otopine n–heksana s 0,025 % BHT–a i homogenizira se na tresilici 30 minuta. Kiveta se stavi u centrifugu na 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. Nakon centrifuge, otpipetira se 5 mL gornjeg heksanskog sloja koji se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 μL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 μm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV–Vis detekcijom.

3.3.2. Priprema uzoraka 2

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $2,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 10 mL ultračiste vode te se sadržaj miješa na vibracijskoj miješalici pola minute. Potom se u uzorak doda 10 mL otopine n-heksana s 0,025 % BHT-a i homogenizira se na tresilici 30 minuta. Kiveta se stavi u centrifugu na 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. Nakon centrifuge, otpipetira se 5 mL gornjeg heksanskog sloja koji se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV-Vis detekcijom.

3.3.3. Priprema uzoraka 3

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $1,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, 1,0 g lipaze te se doda 5 mL ultračiste vode i 5 mL fosfatnog pufera. Sadržaj se homogenizira na vibracijskoj miješalici pola minute te se stavi u ultrazvučnu kupelj na dva sata na 37 °C. Nakon kupelji, u kivetu se doda 2,5 mL otopine etanol:metanol (95:5 v/v), 0,25 g kalijeva karbonata i 10 mL otopine n-heksana s 0,025 % BHT-a. Sadržaj se miješa na vibracijskoj miješalici pola minute, homogenizira se na tresilici 30 minuta te se stavi u centrifugu na 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. Nakon centrifuge, otpipetira se 5 mL gornjeg heksanskog sloja koji se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV-Vis detekcijom.

3.3.4. Priprema uzoraka 4

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $0,5 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 4 mL otopine etanola s 0,025 % BHT-a i 2 mL ultračiste vode. Sadržaj se miješa na vibracijskoj miješalici pola minute, stavi se u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta na 37 °C te se potom centrifugira 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. U međuvremenu, na vakuum sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi postave se SPE HLB kolonice (onoliko koliko ima uzoraka). Za pripremu uzorka, kolonica se kondicionira s 1 mL metanola i 1 mL ultračiste vode na način da

se pusti da punilo upije otapalo. Potom se pažljivo otpipetira 4 mL uzorka (gornji sloj) i stavi na kolonicu. Uzorak se propušta kap po kap. Nakon propuštanja uzorka, kolonica se ispere s 1,5 mL 5 %-tne otopine metanola, a onda se osuši uključivanjem slabog vakuuma. Kada je kolonica suha, isključi se vakuum i ispod kolonice postavi se epruveta u koju će se skupljati eluat. Analit s kolonice prvo se eluira s 1 mL otopine izopropanol:acetonitril (1:1 v/v), a potom s 1 mL 20 %-tnog etil-acetata u acetonitrilu. Skupljeni eluat se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV-Vis detekcijom.

3.3.5. Priprema uzoraka 5

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $2,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 5 mL otopine etanola s 0,025 % BHT-a i 5 mL ultračiste vode. Sadržaj se miješa na vibracijskoj miješalici pola minute, stavi se u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta na 37 °C te se potom centrifugira 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. U međuvremenu, na vakuum sustav za ekstrakciju na čvrstoj fazi postave se SPE C18 kolonice (onoliko koliko ima uzoraka). Za pripremu uzorka, kolonica se kondicionira s 10 mL metanola i 5 mL ultračiste vode na način da se pusti da punilo upije otapalo. Potom se pažljivo otpipetira 5 mL uzorka (gornji sloj) i stavi na kolonicu. Uzorak se propušta kap po kap. Nakon propuštanja uzorka, kolonica se ispere s 5 mL 10 %-tne otopine metanola i potom se osuši uključivanjem slabog vakuuma. Kada je kolonica suha, isključi se vakuum i ispod kolonice postavi se epruveta u koju će se skupljati eluat. Analit s kolonice eluira se sa 6 mL metanola. Skupljeni eluat se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV-Vis detekcijom.

3.3.6. Priprema uzoraka 6

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $1,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 0,5 g limunske kiseline monohidrata, 20 mL etanola i 5 mL 60 %-tne otopine kalijeva hidroksida. Sadržaj se miješa na vibracijskoj miješalici pola minute i homogenizira 30 minuta

na tresilici. Potom se kiveta stavi u vodenu kupelj i zagrijava 30 minuta na 70 °C. Nakon kupelji, kiveta se ohladi do sobne temperature. Potom se uzorak ekstrahira s 10 mL otopine heksan:etil–acetat (85:15 v/v) i homogenizira 30 minuta na tresilici. Kiveta se stavi u centrifugu na 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. Nakon centrifuge, otpipetira se 5 mL gornjeg heksanskog sloja koji se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV–Vis detekcijom.

3.3.7. Priprema uzoraka 7

U kivetu za centrifugu od 50 mL odvaži se $2,0 \pm 0,05$ g homogeniziranog uzorka, doda se 8 mL etanola te se sadržaj ekstrahira 30 minuta na tresilici. Potom se u uzorak doda 10 mL otopine n–heksana s 0,025 % BHT–a i homogenizira se na tresilici 30 minuta. Kiveta se stavi u centrifugu na 15 minuta na 4600 okretaja/minuta. Nakon centrifuge, otpipetira se 5 mL gornjeg heksanskog sloja koji se upari do suhog u struji dušika pri 50 °C. Upareni ekstrakt otopi se u 500 µL otopine acetonitril:metanol (75:25 v/v), miješa se na vibracijskoj miješalici pola minute i filtrira kroz membranski filter s promjerom pora 0,45 µm u bočicu za uzorkivač. Tako pripremljen uzorak analizira se na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV–Vis detekcijom.

3.4. Kromatografski uvjeti

Pripremljeni uzorci dječje hrane analizirani su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s UV–Vis detektorom, model Agilent 1200 Series. Kromatografsko odjeljivanje postignuto je na koloni *Phenomenex C18* dimenzija 250 mm x 4,6 mm; 5 µm uz gradijentno eluiranje smjesom acetonitrila i metanola. Volumen injektiranja iznosio je 20 µL, brzina protoka pokretne faze postavljena je na 1 mL min⁻¹, temperatura kolone održavana je na 45 °C, a valna duljina detekcije postavljena je na 235, 265 i 325 nm. Nakon HPLC analize, dobiveni kromatogrami analizirani su u programu *ChemStation*.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom dijelu rada, prikazani su rezultati HPLC analize vitamina A, D, E i K u četiri uzorka dječje hrane. Svaki uzorak pripremljen je na sedam načina pripreme koje se temelje na četiri postupka. Pripreme 1, 2 i 7 temelje se na ekstrakciji otapalom (ekstrakcija tekuće–tekuće), pripreme 4 i 5 temelje se na ekstrakciji na čvrstoj fazi, temelj pripreme 3 je enzimaska hidroliza, a priprema 6 je primjer saponifikacije. Interpretirajući rezultate analize, doći će se do rješenja koja priprema je najbolja, a koja najlošija za simultano određivanje sva četiri vitamina u uzorcima dječje hrane.

Dobiveni rezultati analize, tj. maseni udjeli vitamina statistički su obrađeni (pododjeljak 4.1.) i izračunata su dopuštena odstupanja na deklarirane vrijednosti prema vodiču Europske unije (pododjeljak 4.2.). Potom su vrijednosti masenih udjela vitamina dobivenih analizom uspoređene s vrijednostima masenih udjela vitamina na deklaracijama proizvoda te su pripreme rangirane od najbolje ka najlošijoj preko dva kriterija za svaki vitamin (pododjeljak 4.3.). Eksperimentalno dobiveni poretci priprema uspoređeni su s prethodnim istraživanjima o pripremanju uzoraka hrane za određivanje vitamina topljivih u mastima (pododjeljak 4.4.).

4.1. Maseni udio vitamina u analiziranim uzorcima dječje hrane korištenjem HPLC tehnike

U tablici 5 prikazane su dobivene vrijednosti masenih udjela vitamina u uzorcima za svaku pripremu. Rezultati su obrađeni u računalnom programu Microsoft Excel 2016 i prikazani su kao srednja vrijednost triplikata, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (KV). Ukoliko se u ćeliji nalazi '-', to znači da u navedenom uzorku nije deklariran navedeni vitamin.

Tablica 5. Analizom dobivene vrijednosti masenih udjela vitamina u uzorcima.

UZORCI	VITAMINI	A ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)	D ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)	E ($\text{mg} / 100 \text{ g}$)	K ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)
		sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)
PRIPREMA 1	MLIJEKO	352,33 \pm 9,07; (2,58)	4,00 \pm 0,14; (3,54)	1,95 \pm 0,21; (10,88)	17,00 \pm 0,62; (3,67)
	ČOKOLINO	–	–	6,50 \pm 0,57; (8,70)	–
	SUHA KAŠICA	218,33 \pm 2,08; (0,95)	1,55 \pm 0,21; (13,69)	6,53 \pm 0,32; (4,92)	–
	TEKUĆA KAŠICA	92,27 \pm 0,55; (0,60)	0,40 \pm 0,00; (0,00)	–	–
PRIPREMA 2	MLIJEKO	13,75 \pm 1,34; (9,77)	0,30 \pm 0,00; (0,00)	0,08 \pm 0,04; (47,14)	21,00 \pm 1,41; (6,73)
	ČOKOLINO	–	–	0,80 \pm 0,28; (35,36)	–
	SUHA KAŠICA	32,40 \pm 0,44; (1,35)	nije detektirano	0,80 \pm 0,14; (17,68)	–
	TEKUĆA KAŠICA	nije detektirano	nije detektirano	–	–
PRIPREMA 3	MLIJEKO	454,33 \pm 5,13; (1,13)	9,27 \pm 0,35; (3,79)	11,60 \pm 0,62; (5,38)	36,33 \pm 0,58; (1,59)
	ČOKOLINO	–	–	3,27 \pm 0,21; (6,37)	–
	SUHA KAŠICA	279,67 \pm 3,51; (1,26)	60,15 \pm 0,07; (0,12)	3,87 \pm 0,06; (1,49)	–
	TEKUĆA KAŠICA	59,00 \pm 1,00; (1,69)	0,70 \pm 0,00 (0,00)	–	–
PRIPREMA 4	MLIJEKO	199,50 \pm 2,12; (1,06)	3,30 \pm 0,42; (12,86)	1,05 \pm 0,07; (6,73)	5,80 \pm 0,14; (2,44)
	ČOKOLINO	–	–	0,54 \pm 0,04; (6,61)	–
	SUHA KAŠICA	13,15 \pm 0,78; (5,91)	0,85 \pm 0,07; (8,32)	3,55 \pm 0,07; (1,99)	–
	TEKUĆA KAŠICA	3,87 \pm 0,15; (3,95)	1,20 \pm 0,10; (8,33)	–	–

UZORCI	VITAMINI	A ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)	D ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)	E ($\text{mg} / 100 \text{ g}$)	K ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)
		sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)	sred. vrij. \pm SD; (KV)
PRIPREMA 5	MLIJEKO	523,50 \pm 30,41; (5,81)	11,50 \pm 0,71; (6,15)	11,75 \pm 0,49; (4,21)	37,50 \pm 2,12; (5,66)
	ČOKOLINO	–	–	4,45 \pm 0,49; (11,12)	–
	SUHA KAŠICA	404,67 \pm 16,80; (4,15)	7,65 \pm 0,35; (4,62)	4,15 \pm 0,07; (1,70)	–
	TEKUĆA KAŠICA	59,67 \pm 2,52; (4,22)	0,83 \pm 0,06; (6,93)	–	–
PRIPREMA 6	MLIJEKO	425,00 \pm 36,10; (8,49)	2,70 \pm 0,10; (3,70)	8,73 \pm 0,45; (5,16)	2,05 \pm 0,07; (3,45)
	ČOKOLINO	–	–	3,03 \pm 0,21; (6,86)	–
	SUHA KAŠICA	426,33 \pm 20,26; (4,75)	2,00 \pm 0,14; (7,07)	1,50 \pm 0,14; (9,43)	–
	TEKUĆA KAŠICA	76,40 \pm 0,98; (1,29)	0,40 \pm 0,00; (0,00)	–	–
PRIPREMA 7	MLIJEKO	99,33 \pm 2,33; (2,34)	4,63 \pm 0,40; (8,72)	1,10 \pm 0,00; (0,00)	nije detektirano
	ČOKOLINO	–	–	2,00 \pm 0,10; (5,00)	–
	SUHA KAŠICA	111,67 \pm 4,51; (4,04)	6,57 \pm 0,31; (4,65)	5,30 \pm 0,00; (0,00)	–
	TEKUĆA KAŠICA	24,33 \pm 1,53; (6,28)	0,55 \pm 0,07; (12,86)	–	–

Legenda: sred. vrij. – srednja vrijednost triplikata, SD – standardna devijacija, KV – koeficijent varijacije.

4.2. Deklarirani maseni udio vitamina u analiziranim uzorcima dječje hrane

Vitamini topivi u mastima vrlo su važni za odvijanje enzimskih i metaboličkih funkcija u tijelu. Oni se većinski ne mogu sintetizirati u ljudskom tijelu te se moraju unositi hranom. Nedostatak ili prevelika količina određenog vitamina može dovesti do zdravstvenih problema, posebice kod djece. Nekoliko istraživanja u SAD–u pokazala su da dječja hrana rijetko sadrži istu količinu vitamina D kao što je navedeno na deklaraciji proizvođača. Također, pokazalo se da je hipervitaminoza D posljedica konzumiranja dječje hrane koje je nepravilno i pretjerano obogaćena vitaminom D.^{46–48}

Djeca, kao najosjetljivija skupina, moraju imati uravnoteženu prehranu koja će im osigurati potrebne količine vitamina koji su neophodni za njihov pravilan rast i razvoj.³²

Stoga, dječja hrana podliježe različitim analizama i strogim propisima Europske unije o dopuštenim odstupanjima (tolerancijama) na deklaraciju hrane. Tolerancija znači prihvatljive razlike između vrijednosti navedenih na deklaraciji i onih utvrđenih tijekom službenih kontrola. Izmjerena vrijednost treba biti unutar odstupanja oko deklarirane vrijednosti. Prema vodiču Europske unije broj 1169/2011, određeno je da tolerancija za vitamine u hrani, uključujući mjernu nesigurnost, iznosi - 35 % (donja granica tolerancije) i + 50 % (gornja granica tolerancije).⁴⁹

U tablici 6 nalaze se deklarirane vrijednosti masenih udjela vitamina u uzorcima, a u tablici 7 je, prema vodiču EU broj 1169/2011, izračunat raspon tolerancije za vitamine u hrani (uključujući mjernu nesigurnost). Ukoliko se u ćeliji nalazi '-', to znači da u navedenom uzorku nije deklariran navedeni vitamin.

Tablica 6. Deklarirane vrijednosti masenih udjela vitamina u uzorcima.

VITAMINI UZORCI	A (µg / 100 g)	D (µg / 100 g)	E (mg / 100 g)	K (µg / 100 g)
MLIJEKO	460	13	12	38
ČOKOLINO	–	–	3,3	–
SUHA KAŠICA	375	7,1	4,8	–
TEKUĆA KAŠICA	65	1,1	–	–

Tablica 7. Raspon tolerancije za vitamine u hrani (uključujući mjernu nesigurnost) prema vodiču EU broj 1169/2011.⁴⁹

VITAMINI UZORCI	A (µg / 100 g)	D (µg / 100 g)	E (mg / 100 g)	K (µg / 100 g)
MLIJEKO	299 – 690	8,45 – 19,5	7,8 – 18	24,7 – 57
ČOKOLINO	–	–	2,145 – 4,95	–
SUHA KAŠICA	243,75 – 562,5	4,615 – 10,65	3,12 – 7,2	–
TEKUĆA KAŠICA	42,25 – 97,5	0,715 – 1,65	–	–

4.3. Usporedba dobivenih rezultata s deklariranim vrijednostima

Kako bi se moglo odrediti koja priprema uzoraka je najbolja za simultano određivanje vitamina A, D, E i K u uzorcima dječje hrane, potrebno je usporediti dobivene rezultate analize s deklariranim vrijednostima. Navedeno je potrebno napraviti za svaki vitamin pojedinačno i na kraju se zaključiti koja priprema je najbolja, a koja najlošija za simultanu analizu sva četiri vitamina.

Prvi korak je usporediti dobivene vrijednosti analize s vrijednostima na deklaracijama proizvoda i vidjeti kolika su odstupanja rezultata analize u odnosu na deklarirane vrijednosti. Stoga, u tablicama 8 – 11 izračunata su odstupanja dobivenih rezultata od deklariranih vrijednosti za svaki vitamin u uzorku tako da se od deklarirane vrijednosti za svaki vitamin u uzorku (tablica 6) oduzela analizom dobivena srednja vrijednost masenog udjela promatranog vitamina u promatranom uzorku (tablica 5). Ukoliko se u ćeliji nalazi prekrižen broj, to znači da analizom dobivena vrijednost nije unutar dozvoljenih odstupanja, ali je odstupanje za tu vrijednost izračunato kako bi se mogla odrediti i najlošija priprema. Tamo gdje se nalazi '-' znači da instrument nije detektirao vitamin.

Drugi korak je definirati kriterije za rangiranje priprema od najbolje ka lošijoj. Pri analizi prehrambenih proizvoda određeno je da je točnost rezultata važnija od preciznosti.⁵⁰ Stoga, za ovaj slučaj uvedena su dva kriterija koja glase:

1. Priprema je tim bolja ukoliko daje rezultate analize unutar dozvoljenih odstupanja za što veći broj uzoraka.
2. Pripreme koje daju rezultat analize za isti broj uzoraka trebaju se rangirati po preciznosti tako da se vidi koliko precizne rezultate daju promatrane pripreme za sve uzorke. Ona priprema koja je najpreciznija (ima najmanje odstupanje od deklaracije) za što veći broj uzoraka je najbolja od promatranih.

Rangiranje priprema po kriterijima je napravljeno za svaki vitamin pojedinačno te je na kraju zaključeno koja priprema je najbolja, a koja najlošija za simultano određivanje vitamina A, D, E i K u uzorcima dječje hrane.

4.3.1. Usporedba rezultata za vitamin A

U tablici 8 nalaze se analizom dobivene vrijednosti masenog udjela vitamina A za svaki uzorak pripremljen na sedam načina pripreme (analizom dobiveno), deklarirana vrijednost

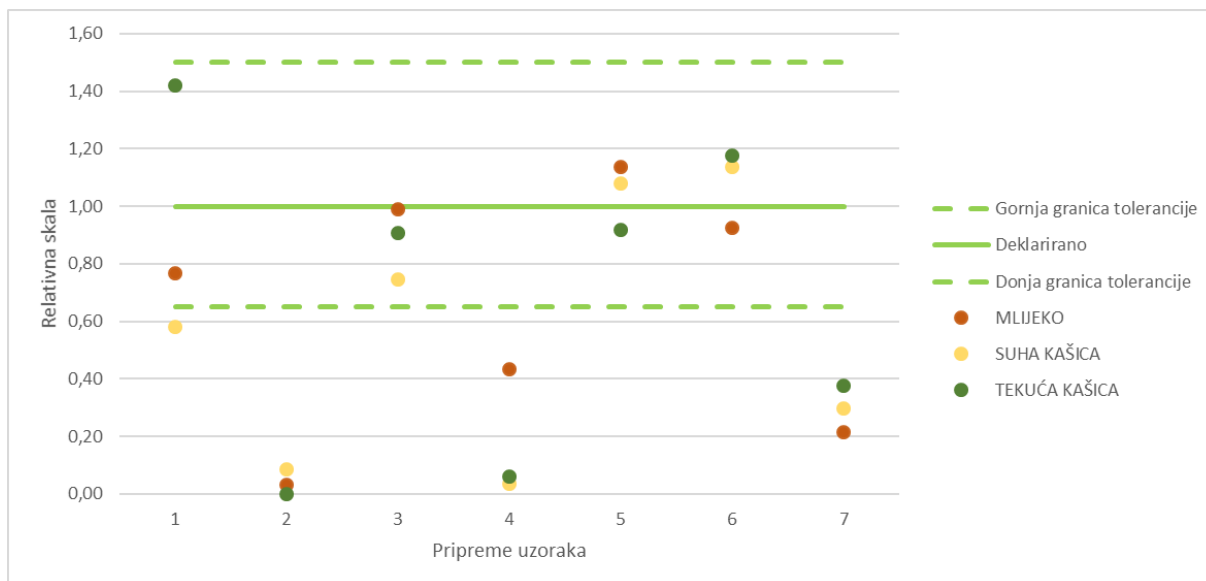
masenog udjela vitamina A u promatranom uzorku (deklarirano), oznaka DA/NE koja govori je li analizom dobivena vrijednost unutar tolerancijskog raspona te odstupanje dobivene vrijednosti od deklarirane vrijednosti (odstupanje).

Podaci iz tablice 8 prikazani su grafički na slici 7. Puna zelena linija definira relativnu deklariranu vrijednost za vitamin A u svim uzorcima (na slici označena vrijednošću od 1,00), iscrtkane zelene linije označuju prihvatljiv relativan tolerancijski raspon za vitamin A za sve uzorke (donja granica tolerancije je na slici označena vrijednošću od 0,65 jer prema vodiču EU br. 1169/2011 donja granica tolerancije iznosi - 35 %; dok je gornja granica tolerancije na slici označena vrijednošću od 1,50 jer prema navedenom vodiču gornja granica tolerancije iznosi + 50 %). Slika 7 prikazuje koliko, analizom dobivene vrijednosti vitamina A u uzorcima, odstupaju od relativne deklarirane vrijednosti. Pri određivanju najbolje pripreme pretpostavlja se da najbolja priprema daje rezultate analize unutar tolerancijskog područja za što veći broj uzoraka te da su ta mjerenja što bliža deklariranoj vrijednosti.

Pomoću tablice 8 i slike 7 rangirat će se svih sedam priprema od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina A u uzorcima dječje hrane preko definirana dva kriterija.

Tablica 8. Vrijednosti potrebne za određivanje poretka priprema uzoraka za analizu vitamina A u dječjoj hrani.

Vitamin A													
UZORCI		MLIJEKO				SUHA KAŠICA				TEKUĆA KAŠICA			
PRIPREMA	VRIJEDNOSTI	ANALIZOM DOBIVENO, µg/100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, µg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, µg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE
		PRIPREMA 1	352,33	460 (299 – 690)	DA	107,67	218,33	375 (243,75 – 562,5)	NE	456,67	92,27	65 (42,25 – 97,5)	DA
PRIPREMA 2	13,75	NE	446,25		32,40	NE	342,60		–	–			
PRIPREMA 3	454,33	DA	5,67		279,67	DA	95,33		59,00	6,00			
PRIPREMA 4	199,50	NE	260,50		13,15	NE	361,85		3,87	61,13			
PRIPREMA 5	523,50	DA	63,50		404,67	DA	29,67		59,67	5,33			
PRIPREMA 6	425,00	DA	35,00		426,33	DA	51,33		76,40	11,40			
PRIPREMA 7	99,33	NE	360,67		111,67	NE	263,33		24,33	40,67			



Slika 7. Određivanje vitamina A u različitim uzorcima dječje hrane u ovisnosti o sedam načina pripreme uzoraka.

- Rangiranje priprema uzoraka od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina A u uzorcima dječje hrane:

Kriterij 1:

Vitamin A nalazi se u tri od četiri uzorka; u mlijeku, suhoj i tekućoj kašici.

Iz slike 7 vidi se da pripreme 3, 5 i 6 daju vrijednost masenog udjela vitamina A unutar tolerancijskog raspona u sva tri uzorka. Priprema 1 daje rezultat analize unutar dozvoljenih odstupanja za dva od tri uzorka, dok se s priprema 2, 4 i 7 ne dobiva prihvatljiva količina vitamina A ni u jednom uzorku.

Već ovdje se može zaključiti da pripreme 2, 4 i 7 zauzimaju zadnja mjesta u rangiranju priprema. Priprema 1 će biti na četvrtom mjestu, dok kriterij 1 nije dovoljan za rangiranje priprema 3, 5 i 6 i priprema 2, 4 i 7.

Kriterij 2:

U kriterij 2 ulaze pripreme 3, 5 i 6 jer daju rezultate analize za sva tri uzorka i ne zna se koja od te tri pripreme je najpreciznija, tj. daje rezultat analize što bliže deklaraciji za sva tri uzorka, ono sa što manjim odstupanjem. Isto vrijedi i za pripreme 2, 4 i 7. Stoga će se ovdje razmotriti kakve rezultate analize daju navedene pripreme za svaki uzorak.

Prvo će se usporediti pripreme 3, 5 i 6 po tri uzorka gledajući sliku 7 i tablicu 8.

Iz slike 7 i tablice 8 vidljivo je sljedeće: za određivanje vitamina A u uzorku mlijeka priprema 3 daje najmanje odstupanje (čitajući iz tablice 8: odstupanje od 5,67) pošto je roza točka mlijeka gotovo cijela na deklariranoj liniji. Zatim ju slijedi priprema 6 (odstupanje od 35,00), a na zadnjem mjestu je priprema 5 s odstupanjem od 63,50.

Za suhu kašicu najpreciznija priprema je priprema 5 (odstupanje od 29,67), slijedi ju priprema 6 (odstupanje od 51,33) te potom priprema 3 (odstupanje od 95,33).

Iz slike 7 ne može se golim okom razaznati daje li precizniji rezultat priprema 3 ili 5 za tekuću kašicu. Pogledom na tablicu 8 vidi se da za tekuću kašicu priprema 5 daje najprecizniji rezultat pošto ima najmanje odstupanje u vrijednosti od 5,33. Priprema 3 ju slijedi s odstupanjem od 6,00, a priprema 6 se nalazi na zadnjem mjestu (odstupanje od 11,40).

U dva od tri uzorka (suha i tekuća kašica) priprema 5 daje najprecizniji rezultat pa je za određivanje vitamina A najbolja. Priprema 3 ju slijedi jer ima bolji rang od pripreme 6 u dva od tri uzorka (mlijeko i tekuća kašica). Priprema 6 nalazi se na trećem mjestu poretka.

Još su ostale pripreme 2, 4 i 7 za poredati. Njihov poredak nije toliko bitan kao poredak prve tri pripreme pošto ne daju rezultate analize unutar dozvoljenih vrijednosti ni za jedan uzorak, ali želi se zaključiti koja priprema daje najlošiji rezultat u analizi vitamina A u dječjoj hrani.

Analizirajući vitamin A u mlijeku, priprema 4 daje najmanje odstupanje (260,50) pa priprema 7 (odstupanje od 360,67) pa priprema 2 (odstupanje od 446,25). Za suhu kašicu poredak glasi: priprema 7, priprema 4, priprema 2. Za tekuću kašicu priprema 7 daje najbolji rezultat, slijedi ju priprema 4 i na zadnjem mjestu je priprema 2 pošto uopće ne detektira vitamin A.

Sumirajući poredak priprema 2, 4 i 7 za svaki uzorak, najbolja je priprema 7 pošto daje najmanje odstupanje u dva od tri uzorka (suha i tekuća kašica), zatim ju slijedi priprema 4 jer daje bolje rezultate od pripreme 2 u dva od tri uzorka (mlijeko i tekuća kašica). Priprema 2 je uvjerljivo na zadnjem mjestu pošto u tekućoj kašici uopće ne detektira vitamin A, a u ostala dva uzorka daje rezultat analize koji su najdalje od deklaracije (vidljivo iz slike 7).

Uzimajući u obzir rješenja oba kriterija, konačan poredak priprema (od najbolje do najlošije) za **određivanje vitamina A** u uzorcima dječje hrane glasi:

PRIPREMA 5 – PRIPREMA 3 – PRIPREMA 6 – PRIPREMA 1 – PRIPREMA 7 –
PRIPREMA 4 – PRIPREMA 2.

Za vitamine D, E i K provodi se isti postupak.

4.3.2. Usporedba rezultata za vitamin D

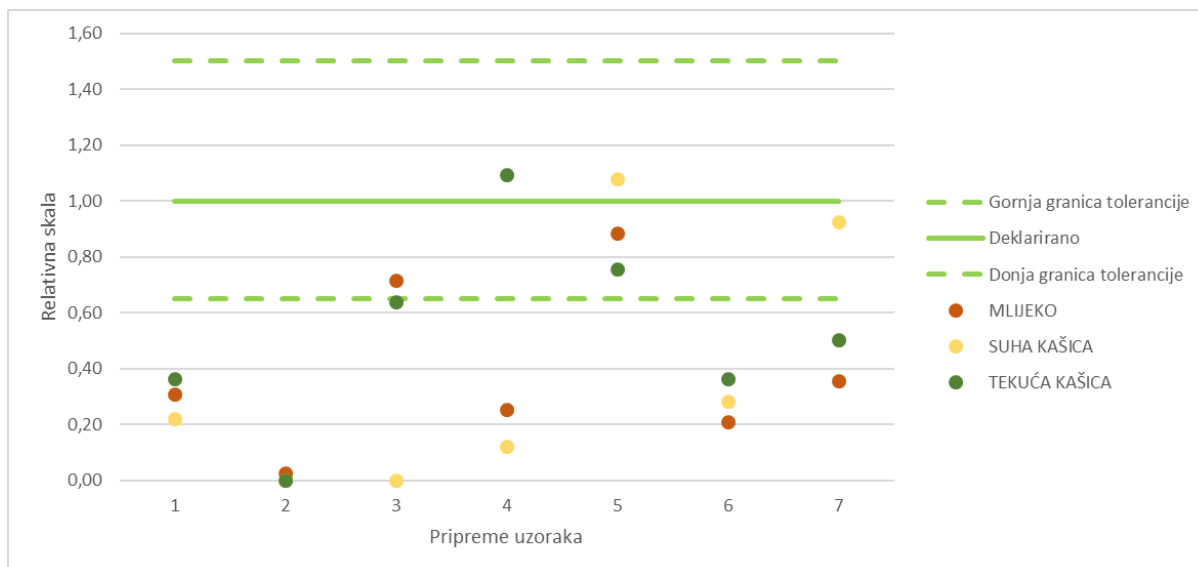
U tablici 9 sortirane su sve vrijednosti koje su potrebne kako bi se mogla odrediti najbolja priprema uzoraka za određivanje vitamina D u dječjoj hrani: analizom dobivene vrijednosti masenog udjela vitamina D za svaki uzorak pripremljen na sedam načina pripreme (analizom dobiveno), deklarirana vrijednost masenog udjela vitamina D u promatranom uzorku (deklarirano), oznaka DA/NE koja govori je li analizom dobivena vrijednost unutar tolerancijskog raspona te odstupanje dobivene vrijednosti od deklarirane vrijednosti (odstupanje).

Podaci iz tablice 9 prikazani su grafički na slici 8, analogno kao i za vitamin A.

Pomoću tablice 9 i slike 8 rangirat će se svih sedam priprema od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina D u uzorcima dječje hrane preko definirana dva kriterija.

Tablica 9. Vrijednosti potrebne za određivanje poretka priprema uzoraka za analizu vitamina D u dječjoj hrani.

Vitamin D														
UZORCI		MLIJEKO				SUHA KAŠICA				TEKUĆA KAŠICA				
PRIPREMA	VRIJEDNOSTI	ANALIZOM DOBIVENO, µg/100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, µg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, µg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	
		PRIPREMA 1	4,00	13 (8,45 – 19,5)		NE	9,00	1,55	7,1 (4,615 – 10,65)	NE	5,55	0,40	1,1 (0,715 – 1,65)	
PRIPREMA 2	0,30	NE	12,70			-	-	-		-	-			
PRIPREMA 3	9,27	DA	3,73			-	-	0,70		NE	0,40			
PRIPREMA 4	3,30	NE	9,70			0,85	NE	6,25		1,20	DA	0,10		
PRIPREMA 5	11,50	DA	1,50			7,65	DA	0,55		0,83	DA	0,27		
PRIPREMA 6	2,70	NE	10,30			2,00	NE	5,10		0,40	NE	0,70		
PRIPREMA 7	4,63	NE	8,37			6,57	DA	0,53		0,55	NE	0,55		



Slika 8. Određivanje vitamina D u različitim uzorcima dječje hrane u ovisnosti o sedam načina pripreme uzoraka.

- Rangiranje priprema uzoraka od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina D u uzorcima dječje hrane:

Kriterij 1:

Vitamin D nalazi se u tri uzorka kao i vitamin A: u mlijeku, suhoj i tekućoj kašici.

Iz slike 8 vidi se da priprema 5 jedina daje vrijednost masenog udjela vitamina D unutar tolerancijskog raspona u sva tri uzorka. Već se ovdje zaključuje da je ona najbolja priprema za određivanje vitamina D.

Pripreme 3, 4 i 7 daju rezultate analize unutar dozvoljenih odstupanja za jedan od tri uzorka, dok se s priprema 1, 2 i 6 ne dobiva prihvatljiva količina vitamina D ni u jednom uzorku. Može se zaključiti da pripreme 1, 2 i 6 zauzimaju zadnja mjesta u rangiranju priprema, a pripreme 3, 4 i 7 se nalaze između pripreme 5 i priprema na zadnjim mjestima. Kako kriterij 1 nije dovoljan za rangiranje priprema 3, 4 i 7 te priprema 1, 2 i 6, one ulaze u kriterij 2.

Kriterij 2:

Prvo će se rangirati pripreme 3, 4 i 7 po uzorcima pomoću slike 8 i tablice 9.

Za određivanje vitamina D u uzorku mlijeka priprema 3 daje odstupanje unutar tolerancijskog raspona u vrijednosti od 3,73, a pripreme 4 i 7 daju rezultate analize van

dopuštenih granica. Između njih, priprema 7 daje nešto manje odstupanje (8,37), nego priprema 4 (9,70).

Za suhu kašicu najpreciznija priprema od promatranih je priprema 7 (odstupanje od 0,53), zatim ju slijedi priprema 4 (odstupanje od 6,25), a s pripremom 3 uopće se nije detektirao vitamin D u uzorku suhe kašice.

Gledajući kakva odstupanja daju promatrane pripreme u uzorku tekuće kašice, iz slike 8 se vidi kako priprema 4 daje odstupanje unutar dozvoljenih vrijednosti (0,10) pa ju slijedi priprema 3 koja daje rezultat skoro pa unutar tolerancijskog raspona (čitajući iz tablice 9: odstupanje od 0,40) i priprema 7 daje najveće odstupanje u vrijednosti od 0,55.

U dva od tri uzorka (mlijeko i suha kašica) priprema 7 daje bolji rezultat od pripreme 4, a priprema 4 daje preciznije rezultate od pripreme 3 u uzorcima kašica. Poredak ovih triju priprema od bolje ka lošijoj je sljedeći: priprema 7, priprema 4 pa priprema 3.

Još su ostale pripreme 1, 2 i 6. Njihov poredak nije toliko bitan kao poredak prijašnjih priprema pošto ne daju rezultate analize unutar dozvoljenih vrijednosti ni za jedan uzorak, ali želi se zaključiti koja priprema daje najlošiji rezultat u analizi vitamina D u dječjoj hrani.

Iz slike 8 vidi se da priprema 2 uopće ne daje rezultate analize za uzorke kašica, a za uzorak mlijeka daje ogromno odstupanje (12,70). Može se zaključiti da je priprema 2 uvjerljivo najlošija priprema za određivanje vitamina D.

Ostaju pripreme 1 i 6 za rangirati. Iz slike 8 vidi se da obje pripreme daju slične rezultate za sva tri uzorka. Za mlijeko, priprema 1 daje manje odstupanje (9,00) od pripreme 6 (10,30) pa je za analizu mlijeka ona bolja. Obrnut redosljed je za uzorak suhe kašice; tu priprema 6 (5,10) daje manje odstupanje od pripreme 1 (5,55). Za konačan poredak između dviju priprema odlučit će uzorak tekuće kašice. Međutim, iz slike 8 i tablice 9 vidljivo je da obje pripreme daju isto odstupanje (0,70). Stoga, pripreme će se rangirati preko teorijskog dijela. Kao što je rečeno u literaturnom pregledu, vitamin D nije stabilan u kiselom mediju. U pripremi 1 koristi se klorovodična kiselina koja razara navedeni vitamin, stoga, u rangiranju priprema 6 i 1, pripremi 6 se daje prednost.

Uzimajući u obzir rješenja oba kriterija, konačan poredak priprema (od najbolje do najlošije) za **određivanje vitamina D** u uzorcima dječje hrane glasi:

PRIPREMA 5 – PRIPREMA 7 – PRIPREMA 4 – PRIPREMA 3 – PRIPREMA 6 –
PRIPREMA 1 – PRIPREMA 2.

Za vitamine E i K provodi se isti postupak.

4.3.3. Usporedba rezultata za vitamin E

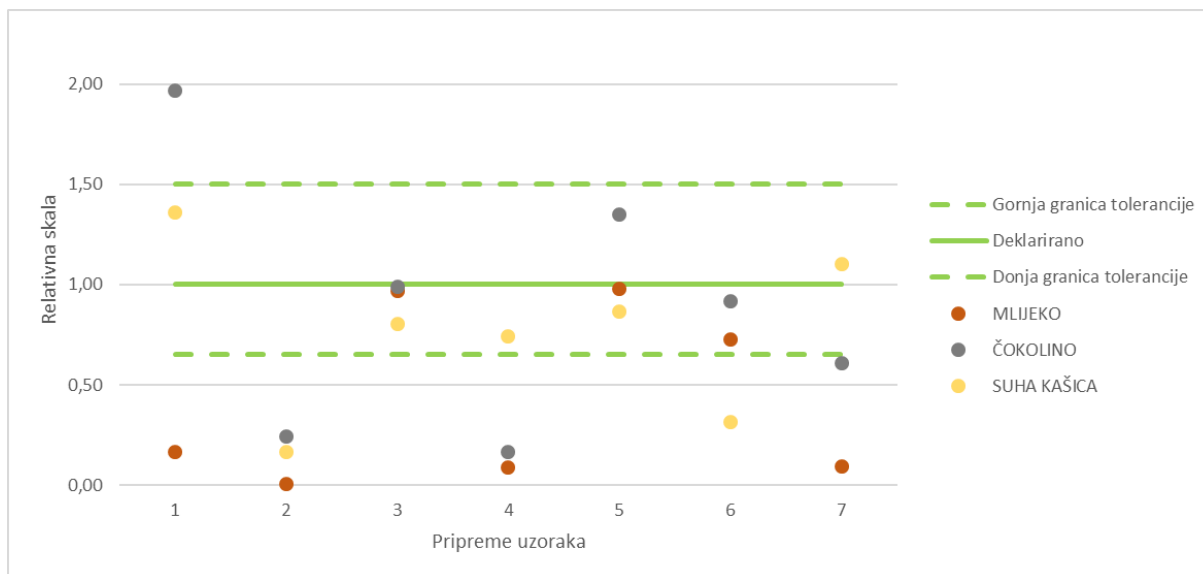
U tablici 10 nalaze se analizom dobivene vrijednosti masenog udjela vitamina E za svaki uzorak pripremljen na sedam načina pripreme (analizom dobiveno), deklarirana vrijednost masenog udjela vitamina E u promatranom uzorku (deklarirano), oznaka DA/NE koja govori je li analizom dobivena vrijednost unutar tolerancijskog raspona te odstupanje dobivene vrijednosti od deklarirane vrijednosti (odstupanje).

Podaci iz tablice 10 prikazani su grafički na slici 9, analogno kao i za prethodne vitamine.

Pomoću tablice 10 i slike 9 rangirat će se svih sedam priprema od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina E u uzorcima dječje hrane preko definirana dva kriterija.

Tablica 10. Vrijednosti potrebne za određivanje poretka priprema uzoraka za analizu vitamina E u dječjoj hrani.

Vitamin E													
UZORCI		MLIJEKO				ČOKOLINO				SUHA KAŠICA			
PRIPREMA	VRIJEDNOSTI	ANALIZOM DOBIVENO, mg/100g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), mg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, mg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), mg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE	ANALIZOM DOBIVENO, mg / 100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), mg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE
		PRIPREMA 1	1,95	12 (7,8 – 18)	NE	10,05	6,50	3,3 (2,145 – 4,95)	NE	3,20	6,53	4,8 (3,12 – 7,2)	DA
PRIPREMA 2	0,08	NE	11,93		0,80	NE	2,50		0,80	NE	4,00		
PRIPREMA 3	11,60	DA	0,40		3,27	DA	0,03		3,87	DA	0,93		
PRIPREMA 4	1,05	NE	10,95		0,54	NE	2,77		3,55	DA	1,25		
PRIPREMA 5	11,75	DA	0,25		4,45	DA	1,15		4,15	DA	0,65		
PRIPREMA 6	8,73	DA	3,27		3,03	DA	0,27		1,50	NE	3,30		
PRIPREMA 7	1,10	NE	10,90		2,00	NE	1,30		5,30	DA	0,50		



Slika 9. Određivanje vitamina E u različitim uzorcima dječje hrane u ovisnosti o sedam načina pripreme uzoraka.

- Rangiranje priprema uzoraka od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina E u uzorcima dječje hrane:

Kriterij 1:

Vitamin E nalazi se u tri uzorka: u mlijeku, čokolinu i suhoj kašici.

Iz slike 9 vidi se da pripreme 3 i 5 daju vrijednosti masenog udjela vitamina E unutar tolerancijskog raspona u sva tri uzorka te će jedna od njih dvije biti najbolja priprema za određivanje vitamina E u dječjoj hrani. Kriterij 2 će ih rangirati.

Priprema 6 jedina daje rezultat analize unutar dozvoljenih odstupanja za dva od tri uzorka (mlijeko i čokolino) te će biti na trećem mjestu u ukupnom poretku priprema, nakon priprema 3 i 5.

Pripreme 1, 4 i 7 daju rezultate analize unutar dozvoljenih odstupanja za jedan od tri uzorka, dok se s pripremom 2 ne dobiva prihvatljiva količina vitamina E ni u jednom uzorku. Može se zaključiti da je priprema 2 najlošija priprema za određivanje vitamina E i zauzima zadnje mjesto u ukupnom rangiranju priprema.

Rangiranje priprema 1, 4 i 7 će se utvrditi kriterijem 2, ali sa rezultatima ovog kriterija može se reći da će navedene pripreme biti smještene između pripreme 6 i pripreme 2.

Kriterij 2:

Prvo će se rangirati pripreme 3 i 5 po uzorcima pomoću slike 9 i tablice 10.

Iz slike 9 ne može se golim oko vidjeti daje li priprema 3 ili priprema 5 precizniji rezultat za analizu vitamina E u uzorku mlijeka. Pogledom na tablicu 10 vidi se da je priprema 5 preciznija jer daje manje odstupanje (0,25) nego priprema 3 (0,40).

Što se tiče uzorka čokolina, iz slike 9 se jasno vidi da priprema 3 daje skoro identičan rezultat kao na deklaraciji (odstupanje je u vrijednosti od 0,03) te je mnogo preciznija od pripreme 5.

U uzorku suhe kašice, priprema 5 daje manje odstupanje (0,65) od pripreme 3 (0,93).

U dva od tri uzorka (mlijeko i suha kašica) priprema 5 je preciznija od pripreme 3 i može se zaključiti da je priprema 5 najbolja za analizu vitamina E u uzorcima dječje hrane, a slijedi ju priprema 3.

Još su ostale pripreme 1, 4 i 7 za rangirati. Njihov poredak nije toliko bitan pošto se već zna da priprema 5 daje najbolje, a priprema 3 najlošije rezultate analize kod određivanja vitamina E u dječjoj hrani, ali kako se odredio ukupan poredak priprema za vitamine A i D, odredit će se i za vitamin E.

Iz tablice 10 vidi se da je za mlijeko najpreciznija priprema 1 pošto ima najmanje odstupanje (10,05) od preostale dvije pripreme. Slijedi ju priprema 7 s nešto većim odstupanjem (10,90) i priprema 4 s odstupanjem u vrijednosti od 10,95.

Za uzorak čokolina, priprema 7 je skoro dala rezultat analize unutar tolerancijskog područja (odstupanje od 1,30). Priprema 4 (odstupanje od 2,77) je bolja od pripreme 1 (odstupanje od 3,20) jer daje manje odstupanje.

Što se tiče suhe kašice, iz slike 9 vidi se da sve promatrane pripreme daju rezultat unutar tolerancijskih granica; priprema 7 je najpreciznija (odstupanje od 0,50), zatim ju slijedi priprema 4 (odstupanje od 1,25) pa ju stiže priprema 1 (odstupanje od 1,73).

Sumirajući poredak priprema 1, 4 i 7 za svaki uzorak, zaključuje se da je konačan poredak navedenih priprema (od bolje ka lošijoj) priprema 7 pa priprema 4 pa priprema 1 jer takav poredak se pojavljuje u dva od tri uzorka (čokolino i suha kašica).

Uzimajući u obzir rješenja oba kriterija, konačan poredak priprema (od najbolje do najlošije) za **određivanje vitamina E** u uzorcima dječje hrane glasi:

PRIPREMA 5 – PRIPREMA 3 – PRIPREMA 6 – PRIPREMA 7 – PRIPREMA 4 –
PRIPREMA 1 – PRIPREMA 2.

Za vitamin K provodi se isti postupak.

4.3.4. Usporedba rezultata za vitamin K

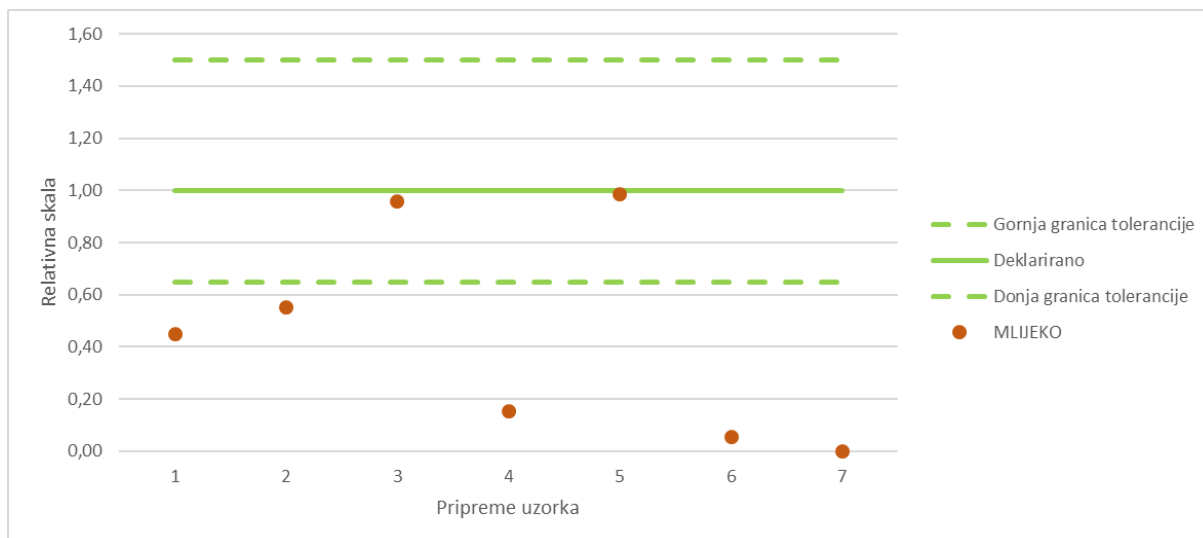
U tablici 11 nalaze se analizom dobivene vrijednosti masenog udjela vitamina K za svaki uzorak pripremljen na sedam načina pripreme (analizom dobiveno), deklarirana vrijednost masenog udjela vitamina K u promatranom uzorku (deklarirano), oznaka DA/NE koja govori je li analizom dobivena vrijednost unutar tolerancijskog raspona te odstupanje dobivene vrijednosti od deklarirane vrijednosti (odstupanje).

Podaci iz tablice 11 prikazani su grafički na slici 10, analogno kao i za vitamine A, D i E.

Pomoću tablice 11 i slike 10 rangirat će se svih sedam priprema od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina K u uzorcima dječje hrane preko definirana dva kriterija.

Tablica 11. Vrijednosti potrebne za određivanje poretka priprema uzoraka za analizu vitamina K u dječjoj hrani.

Vitamin K					
UZORCI		MLIJEKO			
PRIPREMA	VRIJEDNOSTI	ANALIZOM DOBIVENO, µg/100 g	DEKLARIRANO (TOLERANCIJSKI RASPON), µg / 100 g	UNUTAR TOLERANCIJE (DA/NE)	ODSTUPANJE
PRIPREMA 1		17,00	38 (24,7 – 57)	NE	21,00
PRIPREMA 2		21,00		NE	17,00
PRIPREMA 3		36,33		DA	1,67
PRIPREMA 4		5,80		NE	32,20
PRIPREMA 5		37,50		DA	0,50
PRIPREMA 6		2,05		NE	35,95
PRIPREMA 7		–		–	–



Slika 10. Određivanje vitamina K u različitim uzorcima dječje hrane u ovisnosti o sedam načina pripreme uzoraka.

- Rangiranje priprema uzoraka od najbolje ka najlošijoj za određivanje vitamina K u uzorcima dječje hrane:

Kriterij 1:

Vitamin K nalazi se u jednom uzorku i to u mlijeku.

Iz slike 10 vidi se da jedino pripreme 3 i 5 daju vrijednosti masenog udjela vitamina K unutar tolerancijskog raspona te će jedna od njih dvije biti najbolja priprema za određivanje vitamina K u dječjoj hrani. Kriterij 2 će ih rangirati.

Pripreme 1, 2, 4, 6 i 7 nalaze se van dozvoljenih odstupanja te će se rangirati u kriteriju 2.

Kriterij 2:

Prvo će se rangirati pripreme 3 i 5 po uzorcima pomoću slike 10 i tablice 11.

Iz slike 10 ne može se golim oko vidjeti daje li priprema 3 ili priprema 5 precizniji rezultat za analizu vitamina K u uzorku mlijeka. Pogledom na tablicu 11 vidi se da je priprema 5 preciznija jer daje manje odstupanje (0,50) nego priprema 3 (1,67). Pošto se vitamin K nalazi samo u jednom uzorku, zaključuje se da je priprema 5 najbolja za analizu vitamina K, a odmah ju slijedi priprema 3.

Još su ostale pripreme 1, 2, 4, 6 i 7 za rangirati.

Pogledom na sliku 10 jasno se može razaznati koja priprema daje rezultat analize bliže deklariranoj vrijednosti. Priprema 2 je najbliža tolerancijskom rasponu (čitajući iz tablice 11, odstupanje koje daje priprema 2 je 17,00), slijedi priprema 1 (odstupanje od 21,00) pa priprema 4 (odstupanje od 32,20) pa priprema 6 čije odstupanje je 35,95 i priprema 7 je uvjerljivo na zadnjem mjestu s obzirom da instrument uopće nije detektirao vitamin K.

Uzimajući u obzir rješenja oba kriterija, konačan poredak priprema (od najbolje do najlošije) za **određivanje vitamina K** u uzorcima dječje hrane glasi:

PRIPREMA 5 – PRIPREMA 3 – PRIPREMA 2 – PRIPREMA 1 – PRIPREMA 4 –
PRIPREMA 6 – PRIPREMA 7.

4.4. Usporedba rezultata analize s literaturnim podacima

U ovom dijelu rada, uspoređeni su eksperimentalno određeni poretci priprema uzoraka (od najbolje ka najlošijoj) za simultanu analizu vitamina A, D, E i K u dječjoj hrani s dostupnim literaturnim podacima o korištenim priprema.

Svaki uzorak pripremljen je na sedam načina pripreme koje se temelje na četiri postupka. Pripreme 1, 2 i 7 temelje se na ekstrakciji otapalom (ekstrakcija tekuće–tekuće), pripreme 4 i 5 temelje se na ekstrakciji na čvrstoj fazi, temelj pripreme 3 je enzimaska hidroliza, a priprema 6 je primjer saponifikacije (alkalne hidrolize).

U prijašnjem pododjeljku, eksperimentalno su rangirane pripreme uzoraka od najbolje ka najlošijoj za sva četiri vitamina pojedinačno (pripreme označene zelenom bojom daju rezultate analize unutar tolerancijskog raspona za sve uzorke u kojima se nalazi taj vitamin):

- za analizu **vitamina A** u dječjoj hrani poredak od najbolje ka najlošijoj pripremi glasi:

PR. 5 – PR. 3 – PR. 6 – PR. 1 – PR. 7 – PR. 4 – PR. 2,

- za analizu **vitamina D** u dječjoj hrani poredak od najbolje ka najlošijoj pripremi glasi:

PR. 5 – PR. 7 – PR. 4 – PR. 3 – PR. 6 – PR. 1 – PR. 2,

- za analizu **vitamina E** u dječjoj hrani poredak od najbolje ka najlošijoj pripremi glasi:

PR. 5 – PR. 3 – PR. 6 – PR. 7 – PR. 4 – PR. 1 – PR. 2,

- za analizu **vitamina K** u dječjoj hrani poredak od najbolje ka najlošijoj pripremi glasi:

PR. 5 – PR. 3 – PR. 2 – PR. 1 – PR. 4 – PR. 6 – PR. 7.

Gledajući eksperimentalno određene poretke priprema za analizu svakog vitamina pojedinačno, vrlo lako se uočava da je priprema 5 najbolja za simultanu analizu sva četiri vitamina (za sve vitamine u svim uzorcima daje rezultate analize unutar tolerancijskog raspona), dok je priprema 2 najlošija (za sve vitamine u svim uzorcima ne daje vrijednosti analize unutar dozvoljenih vrijednosti te je u većini slučajeva najmanje precizna). S velikom vjerojatnošću može se zaključiti da je priprema 3 druga najbolja priprema za analizu vitamina topivih u mastima s obzirom da za tri od četiri vitamina daje rezultate analize unutar tolerancijskih granica za sve uzorke. Za pripreme 1, 4, 6 i 7 ne može se odrediti poredak pošto ne postoji kriterij kojim bi se oni rangirali.

Temelj pripreme 5 je reverzno–fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi i takav način pripreme kotira vrlo visoko kod pripreme uzoraka dječje hrane za analizu vitamina topivih u mastima.³⁸ Samo priprema 4 daje bolje teorijske rezultate od pripreme 5.⁵¹ Obje pripreme temelje se na reverzno–faznoj ekstrakciji na čvrstoj fazi, što znači da se interferirajuće tvari brzo i lako mogu odvojiti od analita. Međutim, te dvije pripreme razlikuju se u vrsti sorbensa, a potom i u vrsti otapala za eluiranje analita. U pripremi 5 nepokretnu fazu čini nepolaran C18 lanac, dok je kod pripreme 4 SPE kolonica napunjena polimernim HLB sorbensom čija je glavna prednost zadržavanje i nepolarnih i polarnih spojeva.⁵² Kako su vitamini A, D, E i K pretežito nepolarni spojevi, ali ipak s jednom polarnom skupinom u svojoj strukturi, na HLB sorbent se vežu jače nego na C18 lanac te metanol nije dovoljno jako otapalo koje bi ih eluirao. Stoga se, kao eluirajuća otapala u pripremi 4 koriste izopropanol, acetonitril i etil–acetat.⁵³

Priprema 2 pokazala se i eksperimentalno i teorijski najlošijom pripremom.⁴⁵

Vitamini u hrani vezani su za kompleks lipoproteina te je potrebno prekinuti veze masti i proteina te potom dodati reagens koji će slomiti masne kuglice oko vitamina i osloboditi ih.³³ Tu funkciju vrši etanol. U pripremi 2, koja se temelji na ekstrakciji s dva otapala, ne koristi se etanol već voda i heksan. Voda, kao polarno otapalo, otapa isključivo polarne tvari iz uzorka hrane, dok se u heksanu otapaju sve nepolarne interferencije kao i vitamini A, D, E i K koji su „zarobljeni“ u masnim kuglicama.⁵⁴ Upareni ekstrakt sadržava promatrane, „zarobljene“

vitamine, ali i ostale nepolarne tvari iz matrice uzorka koje u daljnjoj analizi stvaraju smetnje koje rezultiraju izrazito lošim rezultatima.

Pripreme 1 i 7 također se temelje na ekstrakciji otapalom.

U pripremi 7 koriste se dva otapala: etanol i heksan. Etanol se pokazao dosta boljim otapalom od vode s obzirom da denaturira proteine iz uzorka i lomi masne kuglice u kojima se nalaze vitamini A, D, E i K.⁵⁴ Dodatkom heksana i centrifugiranjem, oslobođeni vitamini prelaze iz sloja etanola u heksanski sloj, zajedno s nepolarnim interferencijama koje vjerojatno stvaraju smetnje pri kromatografskom odjeljivanju te utječu na krajnji rezultat analize.

Kod pripreme 1, heksan je nepolarno otapalo, dok voda i metanol čine otopinu koja otapa polarne spojeve i denaturira proteine. Međutim, u ovoj pripremi dodaje se i klorovodična kiselina. Vitamini D i K nisu stabilni u kiselom mediju te se ovom pripremom mogu odrediti samo vitamini A i E.⁵⁵

Temelj pripreme 6 je reakcija saponifikacije (alkalne hidrolize) koja se često koristi kao priprema uzoraka složenih matrica kao što je dječja hrana.³² Alkalna hidroliza lomi esterske veze interferirajućih tvari u masnoj hrani poput triglicerida, fosfolipida, sterola te oslobađa vitamine iz lipoproteinskog kompleksa. U hrani, vitamini A i E najčešće se nalaze u formi estera: retinil–acetata, retinil–palmitata i α –tokoferil–acetata te postupkom saponifikacije prelaze u svoje alkoholne forme: retinol i α –tokoferol te sapune. Vitamin D ostaje nepromijenjen, dok vitamin K nije stabilan u lužnatom mediju te postupak saponifikacije nije prikladan za njegovu analizu.^{31,32,55,58}

Nakon saponifikacije slijedi korak ekstrakcije smjesom dva otapala: heksanom i etil–acetatom pri čemu vitamini A, E i D prelaze u organski sloj, a interferencije (sapuni, glicerol) ne.

Priprema 3 je nedestruktivna alternativa saponifikaciji za uklanjanje masnoća iz matrice hrane pri čemu se simultano mogu analizirati sva četiri vitamina. Temelji se na enzimskoj hidrolizi, pri čemu lipaza katalizira reakciju hidrolize estera viših masnih kiselina i hidrolizu estera vitamina A i E. U ranijim istraživanjima, ovaj način pripreme je djelomično pretvorio

retinil–palmitat i α -tokoferil–acetat u alkoholne forme, dok su vitamin D i K ostali nepromijenjeni.^{33,56}

Ekstrakcijom heksana i smjesom etanola i metanola, vitamini prelaze u nepolarno otapalo, dok u smjesi etanola i metanola ostaju denaturirani proteini i ostale polarne interakcije.⁵⁷

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedeno je sedam načina pripreme uzoraka dječje hrane za HPLC analizu vitamina topivih u mastima (A, D, E i K) s ciljem utvrđivanja pripreme koja daje najbolje i najlošije rezultate analize za sva četiri vitamina.

Priprema 5, koja se temelji na ekstrakciji na čvrstoj fazi (s C18 nepokretnom fazom), pokazala se **najboljom**. Ova priprema omogućuje simultanu analizu sva četiri vitamina pri čemu daje rezultate analize za sve vitamine u svim uzorcima unutar tolerancijskog raspona.

Priprema 2 pokazala se uvjerljivo **najlošijom**. Iako je nedestruktivna metoda za sva četiri vitamina (ekstrakcija s vodom i n–heksanom), dobiveni rezultati analize izvan su dozvoljenih vrijednosti za sve vitamine u svim uzorcima.

Pripreme 1, 3, 4, 6 i 7 daju mješovite rezultate.

S priprema 1 i 6 ne mogu se određivati sva četiri vitamina istovremeno s obzirom da je priprema 1 destruktivna za vitamine D i K, dok je priprema 6 nestabilna za vitamin K.

Pripreme 3, 4 i 7 omogućuju analizu sva četiri vitamina, međutim u ovom radu ne daju takve rezultate.

Optimizacija pripreme 5, ali i priprema 3, 4 i 7 (poput promjene parametara otapala, miješanja, centrifugiranja i slično) mogla bi doprinijeti pouzdanijim rezultatima analize vitamina topivih u mastima u uzorcima dječje hrane u budućnosti.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

1. K. V. Aleksandrova, N. P. Rudko, *Biochemistry of Vitamins*, Textbook for students of international faculty, Zaporizhzhya State Medical University, 2016., str. 5–10.
2. D. A. Bender, *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, Cambridge University Press, New York, 2003, str. 10–15.
3. A. Feras, M. Amayreh, A. Massadeh, A. El–Alali, *Iran. J. Chem. Eng.*, **39** (2020) 173–181.
4. R. D. Semba, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **82** (2012) 310–315.
5. J. M. Berg, J. L. Tymoczno, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 20.
6. <https://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/vitamini/> (datum pristupa 20. srpnja 2022.)
7. V. R. Preedy, *Vitamin A and Carotenoids*, RSC Publishing, Cambridge, 2012, str. 74.
8. V. R. Preedy, *Vitamin A and Carotenoids*, RSC Publishing, Cambridge, 2012, str. 73–84.
9. D. A. Bender, *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, Cambridge University Press, New York, 2003, str. 104.
10. M. F. Holick, *Vitamin D, Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*, Humana Press, Boston, 2004, str. 38.
11. DeLuca, H.F., *Vitamin D, Handbook of Lipid Research*, Plenum Press, New York, 1978, str. 69.
12. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 120.
13. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 120–122.
14. J. R. Beattie, C. Maguire, S. Gilchrist, L. J. Barrett, C. E. Cross, F. Possmayer, M. Ennis, J. S. Elborn, W. J. Curry, J. J. McGarvey, B. C. Schock, *FASEB J.* **21** (2007) 766–776.
15. J. W. Suttie, *Vitamin K in Health and Disease*, CRC Press, Florida, 2009, str. 14.
16. J. W. Suttie, *Vitamin K in Health and Disease*, CRC Press, Florida, 2009, str. 13–15, 31.
17. M. Linden, U. Eriksson, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 13001–13004.
18. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-HealthProfessional/> (datum pristupa 25. srpnja 2022.)

19. J. M. Berg, J. L. Tymoczno, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 754–755.
20. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/vitamind-healthprofessional/> (datum pristupa 25. srpnja 2022.)
21. P. Tijan, D. Broznić, *Med. Flum.* **55** (2019) 350–360.
22. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/zdravlje-djece/poremecaji-prehrane/manjak-vitamina-e> (datum pristupa 26. srpnja 2022.)
23. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/> (datum pristupa 26. srpnja 2022.)
24. J. M. Berg, J. L. Tymoczno, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 295.
25. M. J. Shearer, P. Newman, *J. Thromb. Haemost.* **100** (2008) 530–547.
26. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/zdravlje-djece/poremecaji-prehrane/manjak-vitamina-k> (datum pristupa 26. srpnja 2022.)
27. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminK-HealthProfessional/> (datum pristupa 26. srpnja 2022.)
28. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 419.
29. Uredba komisije (EZ) br. 1170/2009, Prilog II, str. 234.
30. M. F. M. Noh, R. D. N. Gunasegavan, N. M. Khalid, V. Balasubramaniam, S. Mustar, A. A. Rashed, *Molecules* **25** (2020) 4567.
31. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 435–438.
32. M. Katsa, C. Proestos, E. Komaitis, *Curr. Res. Nutr. Food Sci. Jour.* **4** (2016) 92–96.
33. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 424.
34. I. J. Cindrić, *Interna skripta iz Ekstrakcijskih tehnika*, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 8–9.
35. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 425–429.
36. E. M. Thurman, M. S. Mills, *Solid–Phase Extraction*, John Wiley & Sons, INC., New York, 1998, str. 25–42.
37. https://www.researchgate.net/figure/Stages-of-solid-phase-extraction-SPE_fig3_312498761 (datum pristupa 27. srpnja 2022.)
38. T. Pérez–Ruiz, C. Martínez–Lozano, M. D. García, J. Martín, *J. Chromatogr. A.* **1141** (2007) 67–72.

39. C. W. Huck, G. K. Bonn, *J. Chromatogr. A.* **885** (2000) 51–72.
40. <https://www.finetech-filters.com/hlb-spe> (datum pristupa 29. srpnja 2022.)
41. A. Martinko, *Analitičke metode za određivanje vitamina*, Završni rad, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 6.
42. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta Kemijskog odsjeka, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006, str. 67.
43. G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K. A. Schug, *Analytical Chemistry*, Wiley, Texas, 2013, str. 31–36.
44. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 448.
45. C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, A. Gentilli, *Trends Anal. Chem.* **87** (2017) 82–97.
46. M. F. Holick, Q. Shao, W. W. Liu, T. C. Chen, *N. Engl. J. Med.* **326** (1992) 1178–1181.
47. S. Blank, K. S. Scanlon, T. H. Sinks, S. Lett, H. Falk, *Am. J.* **85** (1995) 656–659.
48. C. H. Jacobus, M. F. Holick, Q. Shao, T. C. Chen, I. A. Holm, J. M. Kolodny, GE–H. Fuleihan, E. W. Seely, *N. Engl. J. Med.* **326** (1992) 1173–1177.
49. Guidance Document for Competent Authorities for the Control of Compliance with EU Legislation on: Regulation (EU) No 1169/2011, European Commission, Health and Consumers Directorate–General, December 2012, str. 7.
50. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 313.
51. C. W. Huck, G. K. Bonn, *J. Chromatogr. A.* **885** (2000) 51–72.
52. X. Xue, J. You, P. He, *J. Chrom. Sci.* **46** (2008) 345–350.
53. E. M. Thurman, M. S. Mills, *Solid–Phase Extraction*, John Wiley & Sons, INC., New York, 1998, str. 45–46.
54. G. F. M. Ball, *Vitamins in Foods*, Taylor&Francis, Florida, 2006, str. 419.
55. A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, J. F. Van Bocxlaer, *Chromatographic Analysis Of Vitamins*, Marcel Dekker Inc., New York, 2000, str. 104 i 242.
56. D. C. Woolard, H. E. Indyk, B. Y. Fong, K. K. Cook, *J. AOAC Int.* **85** (2002) 682–691.
57. C. Turner, M. Persson, L. Mathiasson, P. Adlercreutz, J. W. King, *Enzyme Microb. Technol.* **29** (2001) 111–121.
58. M. Katsa, N. Papalouka, T. Mavrogianni, I. Papagiannopoulou, M. Kostakis, C. Proestos, N. S. Thomaidis, *Foods* **10** (2021) 1–17.

§ 7. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ida Hećimović

Datum rođenja: 31. listopada 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2004. – 2012. Osnovna škola Medvedgrad, Zagreb

2012. – 2016. VII. gimnazija, Zagreb

2016. – 2020. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020. – Diplomski sveučilišni studij Kemija; smjer: istraživački, grane: analitička i anorganska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno–matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF–u)