

Ispitivanje uticaja zeolita na sadržaj vitamina B₆ u mesu brojlera – validacija metode*

Basić Zorica¹, Kilibarda Vesna², Resanović Radmila³, Maksimović Milan¹

Sadržaj: U veterinarskoj i humanoj medicini zeoliti nalaze sve širu primenu. Kao dijetetski suplementi nalaze se na tržištu Evrope od 1998. godine. Preparati na bazi zeolita koriste se radi adsorpcije aflatoksina i sprečavanja aflatoksikoze, kao i pojavljivanja rezidua aflatoksina u jajima i mesu živine, goveda, ovaca i svinja.

Cilj ovog rada je bio da se ustanovi da li zeolit utiče na resorpciju, odnosno koncentraciju vitamina B₆ u mesu nakon njegove primene u ishrani brojlera. U tu svrhu je dizajniran ogled na 30 brojlera. Tokom 6 nedelja brojleri kontrolne grupe hranjeni su komercijalnom smešom za tov brojlera, dok je eksperimentalna grupa brojlera dobijala komercijalnu smešu, uz dodatak 0,2 posto zeolita. Posle toga je određivan sadržaj vitamina B₆ u mesu primenom jonoizmenjivačke reverzno-fazne HPLC metode sa fluorescentnim detektorom, nakon kisele i enzimske hidrolize uzoraka mesa. Rezultati ukazuju da se nakon dodavanja 0,2 posto zeolita smešama za ishranu brojlera ne ispoljava statistički značajna razlika u sadržaju vitamina B₆ u mesu ogleadne u odnosu na meso kontrolne grupe brojlera.

Ključne reči: zeolit, vitamin B₆, HPLC.

Uvod

Zeoliti su kristalni, hidratizirani aluminosilikati alkalnih i zemnoalkalnih katjona, koji poseduju „beskonačnu“ trodimenzionalnu kristalnu strukturu. Karakterišu se sposobnošću da gube i primaju vodu i izmenjuju neke od svojih konstitucionih katjona, bez većih promena strukture (Dumić i dr., 1990). Kapacitet katjonske izmene prirodnih zeolita je funkcija stepena supstitucije silicijuma aluminijumom u mreži tetraedara, a zavisi i od dimenzije kanala, oblika i veličine jona, gustine naelektrisanja i valencije jona elektrolita.

Zeoliti su pogodni adsorbenti i karakteriše ih slobodna zapremina, od 20 do 50 posto i velika specifična površina. Velike šupljine i ulazni kanali zeolitskog minerala su popunjeni molekulima vode koji grade hidratacione sfere oko izmenljivih katjona. Reakcije jonske izmene su povratne reakcije, slede zakon o dejstvu masa i, kinetički posmatrano, ove reakcije su difuzioni procesi.

U praktičnim uslovima, na kapacitet izmene, koja se postiže između rastvora i zeolita, mogu da utiču mnogobrojni parametri: pH, temperatura, konkurentnost katjona, izbor rastvarača, vrste prisutnih

katjona i koncentracija rastvora. U upotrebi su i sintetski zeoliti i njihovo delovanje se proverava (Mohamed i dr., 2007).

Prisustvo mikotoksina u hrani za životinje ima značajan uticaj na njihov prirast (Resanović i Sinovec, 2006). Preparati na bazi zeolita u veterinarskoj medicini se koriste radi adsorpcije mikotoksina i sprečavanja pojavljivanja mikotoksikoza kao i pojavljivanja rezidua mikotoksina u jajima i mesu živine, goveda, ovaca i svinja (Nešić i dr., 2008).

Obavljena su ispitivanja o uticaju zeolita na redukciju aflatoksina u digestivnom traktu živine i uticaju na prirast i proizvodne rezultate brojlera, dodavanjem hrani u količini od 0,2 posto do 2,5 posto (Cabuk i dr., 2004). Zabeležen je veći dnevni i ukupni prirast u odnosu na grupu koja nije bila zaštićena zeolitom, odnosno gde je manji uticaj mikotoksina. Utvrđeno je da korišćenje zeolita ne utiče značajno na sadržaj vitamina A i E u krvi goveda i ovaca (Ball, 2006). Izvedena su ispitivanja adsorptivnog efekta zeolita na vitamin B₆ u *in vitro* uslovima i ustanovljeno je da između različitih vrsta zeolita postoji značajna razlika u adsorpciji vitamina B₆ (Tomašević-Čanović i dr., 2000).

*Kratak sadržaj rada je objavljen u „Zborniku kratkih sadržaja“ sa Međunarodnog 55. savetovanja industrije mesa, održanog na Tari, od 15. do 17. juna 2009.

¹ Vojnomedicinska akademija, Institut za higijenu, Crnotravska 17, 11 000 Beograd, Republika Srbija;

² Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Crnotravska 17, 11 000 Beograd, Republika Srbija;

³ Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11 000, Beograd, Republika Srbija.

Vitamini se u namirnicama nalaze u malim količinama, ali je njihov efekat uvek značajan. Neadekvatno unošenje vitamina B-kompleksa kod ljudi može da uzrokuje različita patološka stanja sa specifičnim ili nespecifičnim simptomima u vrlo kratkom roku. Cela zrna žitarica, pivski kvasac i meso su izvori tiamina, riboflavina i piridoksina. Biološka vrednost namirnica može da se poveća dodavanjem vitamina, ali i smanji zbog lošeg kvaliteta sirovina, upotrebe nekih aditiva, kontaminacije u toku procesa prerade sirovina ili loše tehnologije. Iz tih razloga neophodna je kontrola sadržaja vitamina u namirnicama.

Zeolit, ili preparati dobijeni na bazi zeolita, se, sve češće, koriste u ishrani brojlera, ćuraka, goveda i svinja. Dodat u hranu za životinje, adsorbuje neke mikotoksine, što omogućava bolji prirast, pri čemu, ne utiče značajno na bioiskoristljivost vitamina A i E iz hrane (*Papaioannou i dr.*, 2002; *Al-Tahan i dr.*, 2006). Imajući u vidu sve širu upotrebu zeolita i preparata na bazi zeolita kao dodatka hrani za životinje i značaj vitamina u ishrani ljudi, nametnula se potreba da se ispita da li (u *in vivo* eksperimentu) zeoliti utiču na resorpciju, odnosno koncentraciju vitamina B u mesu.

Cilj ovog rada je bio da se, primenom HPLC metode sa fluorescentnom detekcijom, utvrdi sadržaj vitamina B₆ u mesu živine hranjene:

- komercijalnom hranom za tov brojlera;
- komercijalnom hranom za tov brojlera, uz dodatak 0,2 posto zeolita; odnosno, da se ispita, da li prisustvo zeolita u hrani utiče na resorpciju i ukupni sadržaj vitamina B₆ u mesu živine.

Materijal i metode

Trideset jednodnevnih brojlera *Hybro PG* + provenijencije, oba pola, poznatog porekla, podeljeni su u dve grupe. Prva grupa je dobijala komercijalnu hranu za tov brojlera sledećeg sastava: smeša broj jedan – starter HBS 22 posto proteina, od 1. do 21. dana tova; smeša broj dva – grover HBS 19 posto proteina, od 21. do 35. dana tova; smeša broj tri – finiše HBS 17 posto proteina, od 35. do 42. dana tova; vitaminsko-mineralni dodatak na jedan kilogram potpune krmne smeše (Vit. B₆ – 5 mg). Druga grupa je dobijala pomenutu hranu, uz dodatak 0,2 posto zeolita, sa više od 90 posto zeolitskog minerala klinoptilolita, komercijalnog naziva *MINAZEL plus*. Brojleri su hranjeni *ad-libitum* sve vreme tova (6 nedelja). Nakon tova pilići su žrtvovani omamljivanjem i presecanjem vene jugularis radi uzorkovanja mesa za analizu. Sadržaj vitamina B₆ određen

je u ohlađenom mesu grudi (belo meso) i bataka sa karabatakom (crveno meso).

Za analizu je korišćen analitički standard vitamina B₆ (proizvođač Sigma Co, St Louis, MO, USA), sertifikovani referentni materijal – *Infant formule NIST-1846*, LGC, metanol (HPLC čistoće, proizvođač Merck, Nemačka), voda HPLC čistoće (dobijena demineralizovana voda prečišćena na komercijalnom Millipore Milli Q sistemu), kiseline, baze i soli (p.a. čistoće).

Od svih predloženih metoda za detekciju vitamina B₆, HPLC metoda sa fluorescentnom detekcijom je jedina specifična i dovoljno osetljiva metoda za ispitivanje namirnica složenog sastava, sa prirodnim sadržajem vitamina. Kisela hidroliza je izvedena primenom 0,1 M HCl u autoklavu, 30 minuta na temperaturi od 120°C, a enzimska hidroliza primenom 10 posto takadiastaze, 4 časa na temperaturi 45°C. Separacija analita izvedena je na HPLC sistemu Waters M600 E, izokratsko eluiranje, Rheodyne 7125 injektor, na analitičkoj koloni Nucleosil 50-5 C18, a detekcija na fluorescentnom detektoru: RF-535 Shimadzu, na talasnim dužinama: 286 nm za ekscitaciju i 392 nm za emisiju. Ispitani su limit detekcije i limit kvantifikacije, specifičnost metode (zbog moguće interferencije vitamina sa reagensima), linearnost odnosa površine pika i koncentracije za standardne rastvore vitamina B₆ u opsegu koncentracija od 0,05 µg/mL do 2,0 µg/mL, preciznost za koncentraciju od 0,5 µg/mL vitamina, kao i analitički prinos metode.

Sadržaj vitamina B₆ u mesu određivan je metodom standardne prave.

Dijagrami zavisnosti površine pikova od koncentracije piridoksina određeni su za koncentracije: 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50 i 2,00 µg/mL, nakon postupka kiselo-enzimske hidrolize. Vrednost površine pika za svaku koncentraciju izračunata je kao srednja vrednost četiri uzastopna merenja. Preciznost HPLC metode za određivanje vitamina B₆ ispitana je za koncentraciju 0,5 µg/mL, nakon šest injektiranja. Za određivanje prinosa metode izvedeno je deset nezavisnih ispitivanja rastvora standarda vitamina B₆ koncentracije 0,5 µg/mL.

Rezultati i diskusija

Određeni su limit detekcije i limit kvantifikacije, koji iznose 0,03 µg/mL, odnosno 0,05 µg/mL. Obavljeno je deset određivanja primenom postupka kiselo-enzimske hidrolize i izračunata srednja vrednost koncentracije vitamina B₆ u rastvorima pripremljenih uzoraka (0,492 µg/mL, Sd = 0,00799 µg/mL). Linearnost odnosa koncentracija i površina

odgovarajućih pikova je određena analizom šest standardnih rastvora vitamina B₆ koncentracija od 0,05 µg/ml do 2,0 µg/mL, koji su podvrgnuti postupcima kiselo-enzimske hidrolize. Tačke za kalibracionu pravu dobijene su kao rezultati četiri ušpricavanja za svaku koncentraciju i određen je koeficijent kalibracije $r = 0,99987$. Reproductivnost je ispitana za standardni rastvor koncentracije 0,5 µg/ml i iznosi 98,4 posto, kao i za uzorak sertifikovanog referentnog materijala koja je 97,7 posto.

Ispitan je sadržaj vitamina B₆ u mesu eksperimentalne i kontrolne grupe brojlera. Određen je sadržaj vitamina B₆ u belom mesu i batacima, primenom HPLC metode sa fluorescentnim detektorom, posle kisele i enzimske hidrolize uzoraka mesa. Rezultati su prikazani u tabeli 1.

šću u opsegu koji obuhvata očekivani sadržaj u uzorcima, a postupci hidrolize dovode uzorak u stanje koje je pogodno za određivanje sadržaja vitamina B₆ u mesu živine.

Zeolit bi mogao, zbog visokog adsorptivnog potencijala, da utiče na resorpciju mnogobrojnih nutrijenata, od kojih su neki, poput vitamina, neophodni za normalan rast i razvoj. Podaci iz literature sugerišu da njihova dugotrajna upotreba u hrani za životinje ne utiče značajno na bioiskoristljivost liposolubilnih vitamina A i E. Objavljeni su podaci da u *in-vitro* uslovima postoji reakcija jonske izmene zeolit-vitamin B₆. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu pokazuju da nakon primene 0,2 posto zeolita u ishrani pilića u tovu nema statistički značajne razlike u sadržaju vitamina B₆ u mesu brojlera koji su do-

Tabela 1. Sadržaj vitamina B₆ u mesu živine
Table 1. Vitamin B₆ content in poultry meat

Uzorak/ Sample	0,2 % zeolita u hrani/ 0,2% of zeolite in feed	Broj uzoraka/ No of samples	Sadržaj vitamina B ₆ (mg/100g)/ Vitamin B ₆ content (mg/100g)	Sd	t vrednost/ t-value	p vrednost/ p-value
Belo meso/ White meat	Ogledna grupa/ Experimental group	15	0,167	0,01465	-0,26719	0,79236
	Kontrolna grupa/ Control group	15	0,184	0,01003		
Batak/ Drumstick	Ogledna grupa/ Experimental group	15	0,229	0,00745	0,25018	0,80528
	Kontrolna grupa/ Control group	15	0,249	0,01465		

Razvojem separacionih tehnika, najčešće se pominje tačna hromatografija sa različitim detekcionim sistemima, i to ultravioletni (UV) detektor za obogaćene namirnice i farmaceutske preparate (*Pei i dr.*, 2007) i fluorescentni detektor za pojedinačne vitamine (*Albala-Hurtado i dr.*, 1997; *Ndaw i dr.*, 2000; *Vinas i dr.*, 2003; *Basić*, 2004; *Koning*, 2006), uz upotrebu različitih mobilnih faza i separacionih kolona. U namirnicama složenog biološkog sastava postoje mnogobrojne interferencije u UV oblasti. Fluorescencija piridoksina omogućava njegovu detekciju specifičnim i osetljivim fluorescentnim detektorom sa promenljivim talasnim dužinama. U prethodnim radovima obavljena je optimizacija ovih parametara za neke namirnice (*Basić i dr.*, 1999; *Basić i dr.*, 2002; *Basić*, 2004), međutim neophodno je bilo da se izvede validacija metode za određivanje vitamina B₆ u mesu živine. Svi ispitani parametri validuju primenjenu metodu kao specifičnu, preciznu i reproductivnu, sa visokim prinosom, linearno-

bijali hranu sa zeolitom u odnosu na meso brojlera kontrolne grupe. Ovim istraživanjem dokazano je da zeolit u ovako formulisanoj hrani za tov brojlera, u koncentraciji od 0,2 posto, ne utiče na resorpciju vitamina B₆, odnosno da utiče na smanjenje količina vitamina B₆ u mesu brojlera.

Zaključak

Uzimajući u obzir obim primene zeolita i proizvoda na bazi zeolita u veterinarskoj praksi, od presudnog je značaja da se odrede njegove adsorpcione sposobnosti za mikroelemente i vitamine u hrani i hranivima za životinje. Ispitivanjem adsorpcione moći zeolita u odnosu na vitamin B₆ dat je značajan doprinos saznanjima o mogućnosti njegove primene u živinarskoj proizvodnji, sa aspekta dobijanja mesa koje zadovoljava sve higijensko-nutricionističke zahteve.

Literatura

- Albala-Hurtado S., Veciana-Nogués M. T., Izquierdo-Pulido M., Macine-Font A., 1997.** Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778, 1–2, 247–253.
- Al-Tahan J., Gonzalez-Gross M., Pietrzik K., 2006.** B-vitamin status and intake in European adolescents. A Review of the Literature, *Nutrition Hospitalaria*, 21, 452–465.
- Ball F. M. G., 2006.** Vitamins in foods analysis, bioavailability and stability. Taylor&Francis, SAD, 149–199.
- Basić Z., 2004.** Procena metode kiselo-enzimske hidrolize za određivanje ukupnog sadržaja vitamina B₁, B₂ i B₆ u jetrenoj pašteti. Magistarski rad. Vojnomedicinska akademija, Beograd.
- Basić Z., Maksimović M., Jakovljević Lj., Obradović G., 1999.** The thiamin, riboflavin and pyridoxine contents in Yugoslav wines. Proceedings of Euro Food Chem X, FECS-Event No. 234, Budapest, 917–921.
- Basić Z., Ražić S., 2002.** Određivanje vitamina rastvorljivih u vodi u biskvitima sa dodatkom sušenog voća HPLC metodom. *Arhiv za farmaciju*, 4, 742–3.
- Cabuk M., Alceick A., Bozkurt M., Akkan S., 2004.** Effect of yucca schidigera and natural zeolite on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 3, 10, 651–654.
- Dumić M., Vukićević O., 1990.** Prirodni zeoliti upotreba u stočarstvu, Beograd.
- Koning J. M. E., 2006.** Committee on food nutrition: water-soluble vitamins. General Referee Reports. *Journal of AOAC International*, 89, 1, 286–288.
- Mohamed M. M., Zidan F. I., Fodail M. H., 2007.** Synthesis of ZSM-5 zeolite of improved bulk and surface properties via mixed templates. *Journal of Materials Science*, 42, 4066–4075.
- Ndaw S., Bergaentzle M., Aoude W. D., Hasselmann C., 2000.** Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. *Food Chemistry*, 71, 1, 129–138.
- Nešić K., Resanović R., Nešić V., Sinovec Z., 2008.** Efficacy of mineral and organic adsorbent in alleviating harmful effects of zearalenone on pigs performance and health. *Acta Veterinaria*, 58, 2–3, 211–219.
- Papaioannou D. S., Kyriakis S. C., Papasteriadis A., Roubi- es N., Yannakopoulos A., Lexopoulos C., 2002.** Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. *Research in Veterinary Science*, 72, 61–68.
- Pei C., Wayne R. W., 2007.** LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Anal Bioanal Chemistry*, 387, 2441–2448.
- Resanović R., Sinovec Z., 2006.** Effects of limited feeding of aflatoxin B₁ contaminated feed on the performance of broilers. *Mycotoxin Research*, 22, 3, 183–189.
- Tomašević-Čanović M., Daković A., Marković V., Rado- savljević-Mihajlović A., Vukićević J., 2000.** Adsorption effects of mineral adsorbents, part III: adsorption behaviour in the presence of vitamin B₆ and mikroele- ments. *Acta Veterinaria*, 50, 1, 23–29.
- Vinas P., Lopez-Erroz C., Balsalobre N., Hernandez-Cordoba M., 2003.** Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatogra- phy A*, 1007, 77–84.

Investigation of zeolites influence on vitamin B₆ content in broilers' chicken meat- method validation

Basić Zorica, Kilibarda Vesna, Resanović Radmila, Maksimović Milan

S u m m a r y: Zeolites are crystal, hydrated aluminosilicates of alkali-metal and alkaline-earth-metal cations which possesses "infinite" three-dimensional crystalline structure, and are characterized with an ability of losing and accepting water and interchanging some of their own constitutional cations. Zeolites are more and more used in veterinary and human medicine. As a dietary supplement, they have been present on the European market since 1998. Zeolite-based products are used to adsorb aflatoxins and prevent aflatoxicosis, as well as appearance of aflatoxins residues in eggs, poultry meat, beef, mutton and pork.

The aim of this paper was to determine, using HPLC method with fluorescent detection, the content of vitamin B₆ in meat of poultry fed with: commercial feed for broilers' fattening; commercial feed for broilers' fattening with the addition of 0,2% of zeolite, i.e. to investigate whether the presence of zeolite in feed has any influence on resorption and total vitamin B₆ content in poultry meat.

For this purpose an experiment on 30 broiler chicken was set. During 6 weeks, control group was fed with commercial broiler chicken fattening mixture, while 0,2% of zeolite was added to the experimental group's commercial mixture. After six weeks vitamin B₆ content was determined by ion-pair reverse-phase HPLC method with fluorescence detector; after acid and enzymatic meat samples hydrolysis. Results show that, after adding 0,2% of zeolite to chicken diet, there was no statistically significant difference in vitamin B₆ content in meat of experimental group, compared with the control group of broiler chicken. Investigation of zeolite adsorption ability of vitamin B₆ gave significant contribution to the studies of the possibilities of its application in poultry production from the aspect of obtaining meat that fulfills all hygienic and nutritional requirements.

Key words: zeolite, vitamin B₆, HPLC.

Rad primljen: 30.04.2009.

Rad prihvaćen: 1.07.2009.